



Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Farmacia y Bioquímica  
Cátedra de Biotecnología - Instituto Nanobiotec



# ESTRATEGIAS DE RIZORREMEDIACIÓN DE GLIFOSATO EN SUELOS BAJO EXPLOTACIÓN AGRÍCOLA INTENSIVA

Tesis Doctoral

Autor: Francisco Massot

Director por la Universidad de Buenos Aires: Prof. Dr. Luciano J. Merini  
Codirector por la Universidad de Buenos Aires: Prof. Dr. Julián Rodríguez Talou  
Director por la Universidad de Hasselt: Prof. Dr. Jaco Vangronsveld

**2018**



---

# Resumen

---

La Pampa Húmeda es la principal región agrícola de Argentina y una de las más importantes de Sudamérica. Allí, el modelo de producción agrícola prevalente implica un uso intensivo de agroquímicos, cuyos residuos ponen en riesgo tanto la salud humana como el equilibrio de los ecosistemas.

Considerando la extensión de la región, la necesidad de preservar la calidad de los suelos y evitando limitar la actividad económica, las técnicas de remediación de bajo costo y aplicación *in situ* resultan la mejor opción para eliminar los niveles residuales de glifosato. La rizorremediación, entendida como el uso de plantas y los microorganismos asociados a su raíz para remover los contaminantes del medio ambiente, surge entonces como la tecnología más promisoría.

En este contexto, el **objetivo general** del presente trabajo de tesis es generar el conocimiento que permita desarrollar un sistema de rizorremediación capaz de mitigar el impacto asociado al uso de glifosato en suelos de la Pampa Húmeda Argentina bajo explotación agrícola intensiva.

Para alcanzar dicho objetivo, se desarrollaron e implementaron metodologías para evaluar la tolerancia radicular y foliar a glifosato en especies vegetales con valor productivo. Posteriormente se realizó el aislamiento y caracterización fenotípica y genotípica de cepas bacterianas tolerantes y degradadoras de glifosato. Durante la caracterización, dos cepas fueron seleccionadas para profundizar su estudio, proceso que involucró la secuenciación de sus genomas completos. Por último, se realizaron ensayos de interacción planta-microorganismo y un ensayo de microcosmos en donde se expusieron diferentes sistemas de rizorremediación a una dosis agronómica de glifosato en suelo.

Entre las especies vegetales evaluadas, *L. corniculatus* fue seleccionada como candidata por ser capaz de tolerar la exposición a 5,0 mg Kg<sup>-1</sup> de glifosato por vía radicular y 700 g ha<sup>-1</sup> por vía foliar.

Se obtuvo un banco de cepas puras y se realizó la caracterización fisicoquímica de los suelos y el estudio de las comunidades microbianas presentes. Se observó que, al momento de explicar las diferencias entre comunidades microbianas, el efecto rizosférico prevalece sobre las características edáficas o aplicaciones crónicas con glifosato.

Casi la totalidad de los microorganismos aislados pertenecen a la clase *Alphaproteobacteria*, y cumplieron los requerimientos de: tolerar la máxima concentración de glifosato reportada en suelos

agronómicos, utilizar glifosato como única fuente de fósforo, y poseer distintas capacidades de promoción de crecimiento vegetal, mostrando todas las cepas al menos tres resultados positivos.

Se secuenció el genoma completo de *Ochrobactrum* sp. P6BS-III y *Rhizobium* sp. P44RR-XXIV, dos cepas que presentaron excelente performance en los ensayos previos, y cuyo genoma no había sido secuenciado previamente o estudiado en profundidad. Mediante comparación *in silico* genoma a genoma se obtuvo información complementaria respecto a la estructura del genoma de *Rhizobium* sp. P44RR-XXIV. A la vez, el genoma de *Ochrobactrum* sp. P6BS-III aportó una gran cantidad de genes al pool génico del género, muchos de ellos sin función conocida.

Por último, se estudió la interacción planta-microorganismo entre cepas bacterianas degradadoras y *L. corniculatus*, mediante ensayos de inoculación en placas verticales, estudios de imágenes utilizando microscopía confocal y microscopía electrónica, y ensayos de microcosmos. En los ensayos en placas verticales las cepas estudiadas pudieron coexistir con la especie vegetal sin provocar ningún signo de daño en ésta, aunque no existieron diferencias significativas para los parámetros biométricos analizados. Las imágenes obtenidas a partir de microscopía evidenciaron los distintos patrones de colonización de *Ochrobactrum* sp. P6BS-III y *Rhizobium* sp. P44RR-XXIV en raíces de *L. corniculatus*. El ensayo de microcosmos develó que *L. corniculatus* inoculado con *Ochrobactrum* sp. P6BS-III podría atenuar casi completamente 5 mg Kg<sup>-1</sup> de glifosato en suelo al cabo de 20 días, tiempo más que alentador para el sistema remediador propuesto.



---

# Abstract

---

The Pampa Húmeda is the main agricultural region of Argentina and one of the most important in South America. There, the prevailing agricultural production model implies an intensive use of agrochemicals, whose residues put at risk both human health and the balance of ecosystems.

Considering the extension of the region, the need to preserve the quality of the soils and avoiding limiting the economic activity, low-cost remediation techniques and on-site application are the best option to eliminate residual levels of glyphosate. The rhizoremediación, understood as the use of plants and microorganisms associated with its root to remove pollutants from the environment, then emerges as the most promising technology.

In this context, the main objective of this thesis work is to generate the knowledge that allows developing a rhizoremediation system capable of mitigating the impact associated with the use of glyphosate in soils of the Argentine Humid Pampas under intensive agricultural exploitation.

To achieve this aim, methodologies were developed and implemented to evaluate root and foliar tolerance to glyphosate in plant species with productive value. Subsequently, phenotypic and genotypic isolation and characterization of glyphosate tolerant and degrading bacteria were performed. During the characterization, two strains were selected to deepen their study, a process that involved the sequencing of their complete genomes. Finally, plant-microorganism interaction trials and a microcosm assay were carried out, where different rhizoremediation systems were exposed to an agronomic dose of glyphosate in soil.

Among the plant species evaluated, *Lotus corniculatus* was selected as a candidate for being able to tolerate exposure to 5.0 mg Kg<sup>-1</sup> of glyphosate via the root route and 700 g ha<sup>-1</sup> via the foliar route.

A culture collection of pure strains was obtained and the physicochemical characterization of the soils and the study of their microbial communities were carried out. It was observed that, when explaining the differences among microbial communities, the rhizospheric effect prevails over the edaphic characteristics or chronic applications with glyphosate.

Almost all the microorganisms isolated belong to the class *Alphaproteobacteria*, and met the requirements of: tolerating the maximum concentration of glyphosate reported in agronomic soils, using glyphosate as the only source of phosphorus, and possessing different capacities for promoting

plant growth, showing all the strains at least three positive results. The whole genome sequencing of two of the most promising strains, *Ochrobactrum* sp. P6BS-III and *Rhizobium* sp. P44RR-XXI was performed. The use of different methodologies of *in silico* genome-to-genome comparison was used to obtain complementary information regarding the genome structure of *Rhizobium* sp. P44RR-XXIV. At the same time, *Ochrobactrum* sp. P6BS-III genome contributed with a large number of unique genes to the genus, many of them having no assigned function.

Finally, plant-microorganism interaction studies were carried out using glyphosate tolerant and degrading bacteria strains together with *L. corniculatus*, which consisted of inoculation tests on vertical agar plates, imaging studies using different microscopy methods and a microcosm assay. In vertical agar plates assays, strains showed a high growth when inoculated with the plant, without causing any sign of damage on them. The microscopy images obtained showed the different colonization patterns of *Ochrobactrum* sp. P6BS-III and *Rhizobium* sp. P44RR-XXIV in roots. The microcosm assay revealed that *L. corniculatus* inoculated with *Ochrobactrum* sp. P6BS-III achieved the degradation of almost all the 5 mg Kg<sup>-1</sup> of glyphosate in soil after 20 days post application, considering this time adequate for the proposed remediation system

---

## Dedicatoria

---

A mis padres, por dejarme ir en contramano y ser la oveja negra, apoyando cada decisión que tomé en mi vida. La convicción por formarnos como personas autónomas, librepensadoras y comprometidas, hizo que me sienta orgulloso de todos mis logros y busque, más que mi bienestar, el de mi patria toda.

A Mercedes, por todos estos años compartidos aguantando mis malhumores, mis obsesiones, mis ausencias y postergaciones que significaron ser becario doctoral. Por devolverme todo esto en forma de amor. No pasa un día en el que no de gracias por haberte conocido.

A Santiago, porque a pesar de haberme hecho culminar tempranamente mi carrera de aeromodelista, me siento muy afortunado de tenerlo cerca y pendiente de mí.

A mis abuelos, por haber sido los cuatro pilares fundamentales de lo que cualquier persona necesita en la vida: una infancia feliz. Sobre todo, a mis dos abuelas, que me enseñaron lo que es ponerse “el equipo al hombro”, ejemplos de cómo pegarle un buen tackle a los malos momentos de la vida y no dejar que te pasen por encima. Hoy mismo me dejaste, abuela. Vos me diste el título más importante que me van a dar en mi vida, el de “bastón”. El trabajo y mis obligaciones hicieron que no esté tan pendiente de vos como ahora entiendo, debería haber estado. Espero no haberte fallado y donde quiera que te encuentres, te sientas orgullosa de tu bastoncito.

A la Doctora Ana María Giulietti, por haberme concedido el lujo de ser su último becario, haberme transmitido su experiencia en el campo de la biotecnología, y una visión crítica del sistema científico y universitario, elementos que ahora considero fundamentales en mi formación. Por su enorme cariño, por las hermosas charlas y por estar siempre dispuesta a escucharme y brindarme valiosos consejos.

A la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires y a la Universidad de Hasselt, por haberme permitido desarrollar mi trabajo doctoral en sus instalaciones, y haberme empapado de sus idiosincrasias.

Al Doctor Luciano Merini, por haberme mostrado el mundo de la fitorremediación y la agrobiotecnología, y por haber transgredido los límites que implicaron su posición de director y haberme concedido el honor de ofrecerme su amistad.

Al Profesor Jaco Vangronsveld, por haberme abierto las puertas del CMK y tratarme desde el primer día como uno más de su grupo.

Al Doctor Julián Rodríguez Talou, por estar siempre que necesité una mano o un consejo, y por sus enigmáticos silencios.

A la Doctora Sofie Thijs, por enseñarme que la fuerza de voluntad y la dedicación mueven montañas, y por su despistada amistad.

Al Doctor Panagiotis Gkorezis, por abrirme las puertas y por haberme ofrecido la calidez de su hogar junto a su hermosa familia. Por enseñarme esa palabra que todo griego debe conocer.

A la Cátedra de Biotecnología e Instituto Nanobiotec, por ser mi segundo hogar durante estos 6 años. A las profesoras Clara Nudel y Victoria Miranda, por su confianza, cariño y apoyo.

A María y a Nicolás, por estar pendiente de mí desde el primer día en el laboratorio, ayudarme a encontrarme en la mesada y a conocer la Cátedra. Por su cariño honesto, por la calidez de su trato, sus consejos y compañía.

A Víctor, Emilia y Julieta, por todas las charlas, mates, y grandes momentos compartidos.

A Lucas, por aportar siempre su visión crítica y perspicaz de muchos de los procesos que desarrollé en este trabajo, y muchos otros que no pudieron llevarse a cabo. Por todos los momentos dentro y fuera del ring. A Susana, por guiarme en la biología molecular y por su cariño.

A mis compañeros en la Cátedra de Biotecnología: Alejandra, Alejandro, Rodrigo, Edgardo, Federico, Walter, Fernanda, Lautaro, Daniela, Lucas, Ariel, Gustavo, Tomás y Mariela. Por dibujarme sonrisas diariamente, y hacer que el trabajo no me pese.

A los mis amigos bioquímicos y farmacéuticos que también me acompañaron en este camino: Martín, Luciano, Victoria, Inés, Soledad, Andrea, Martín, Federico, Verónica y Lucía.

Al grupo Barcelona: Michele, Valeria, Łukasz y Wouter. Por transformar una gran experiencia laboral en una experiencia de vida. Siempre voy a esperar volver a verlos, como a los grandes amigos. La inmensa fortuna de que hoy, sean parte de mi vida.

A las grandes personas del CMK: Giulia, Inge, François, Jordan, Iva, Vincent y Rafaela.

A Florencia Giliberto y Karina Alleva. La forma en que encarán diariamente el trabajo es y será siempre fuente de inspiración.

A mis amigos de la vida: Maximiliano, Felipe, Juan Agustín, Martín, Tomás, Santiago, Emilio, Julián, Lisandro y Matías, por bancarme en las buenas, pero en las malas mucho más.

Finalmente, este trabajo no podría haber sido posible sin la ayuda de la profesora Marta Mollerach. Muchas gracias por creer en estos dos locos.

El siguiente trabajo de tesis forma parte del programa de doble titulación entre Facultad de Farmacia y Bioquímica de la universidad de Buenos Aires y la Universidad de Hasselt.

Por tal motivo, se exponen en el inicio del capítulo 1 correspondiente a “Antecedentes”, nociones básicas sobre el contexto histórico y situación actual en el que se desarrolla la actividad agrícola en el territorio de la Pampa húmeda Argentina.

*A vos, que estás por venir*

---

# Tabla de contenidos

---

<b>Resumen.....</b>	<b>II</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>IV</b>
<b>Dedicatoria .....</b>	<b>VI</b>
<b>Tabla de contenidos.....</b>	<b>XI</b>
<b>Capítulo 1 - Antecedentes .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 La Pampa Húmeda Argentina .....</b>	<b>2</b>
1.1.1 Generalidades de la ecorregión Pampeana .....	2
1.1.2 Desarrollo histórico de la Pampa Húmeda Argentina .....	4
1.1.3 Las consecuencias de la profundización de la agriculturización.....	7
<b>1.2 El herbicida glifosato.....</b>	<b>12</b>
1.2.1 Generalidades sobre el herbicida glifosato .....	12
1.2.2 Propiedades fisicoquímicas del glifosato y persistencia en suelos.....	17
1.2.3 Destino del glifosato y AMPA en suelos de Argentina .....	20
1.2.4 Impacto del glifosato en los ecosistemas .....	25
1.2.5 Impacto del glifosato en la salud humana.....	28
<b>1.3 Estrategias para la remediación de suelos contaminados con agroquímicos.....</b>	<b>30</b>
1.3.1 Biorremediación .....	31
1.3.2 Fitorremediación .....	33
1.3.2.1 Fitotransformación .....	34
1.3.2.2 Fitoestabilización .....	36
1.3.2.3 Fitoextracción .....	36
1.3.2.4 Fitovolatilización .....	36
1.3.2.5 Rizorremediación .....	37



1.4 Una estrategia de rizorremediación de glifosato para la Pampa Húmeda Argentina ...	39
1.5 Referencias .....	40
<b>Capítulo 2 - Plan de tesis .....</b>	<b>53</b>
2.1 Contexto actual de la problemática de contaminación con glifosato, objetivos generales y particulares del plan de tesis .....	54
<b>Capítulo 3 - Estudios de tolerancia a glifosato en especies vegetales de valor productivo .....</b>	<b>57</b>
3.1 Introducción .....	58
3.1.1 Prospección de especies vegetales para su uso en estrategias de fitorremediación.....	58
3.1.2 Selección de especies vegetales candidatas para llevar a cabo ensayos de tolerancia a glifosato .....	59
3.1.3 Estudio de tolerancia a glifosato en especies vegetales .....	63
3.2 Materiales y Métodos .....	66
3.2.1 Origen del germoplasma .....	66
3.2.2 Esterilización superficial de semillas .....	66
3.2.2.1 Optimización de esterilización de semillas de <i>L. corniculatus</i> y <i>L. tenuis</i> .....	67
3.2.2.2 Optimización de esterilización de semillas de <i>L. multiflorum</i> .....	68
3.2.2.3 Optimización de esterilización de semillas de <i>M. sativa</i> .....	68
3.2.3 Ensayo de tolerancia en agar .....	69
3.2.4 Ensayo de aplicación foliar .....	70
3.2.5 Determinación de ácido shikímico y contenido de clorofilas en planta entera .....	72
3.2.6 Análisis de la secuencia parcial de la 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato (EPSP) sintasa (EPSPS, EC 2.5.1.19) .....	73
3.2.7 Análisis estadístico .....	75
3.3 Resultados y discusión .....	76
3.3.1 Ensayo de tolerancia en agar .....	76
3.3.2 Ensayo de aplicación foliar .....	80

3.3.3 Determinación de ácido shikímico y contenido de clorofilas en planta entera .....	82
3.3.4 Análisis de la secuencia parcial de la 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato (EPSP) sintasa (EPSPS, EC 2.5.1.19) .....	84
3.4 Conclusiones.....	87
3.5 Referencias.....	89
S3.1 Material suplementario.....	94
S.3.1.1 Medio Murashige-Skoog (MS) .....	94
S.3.1.2 Solución Hoagland .....	95
S3.1.3 Protocolo para determinar ácido shikímico en tejido vegetal .....	96
<b>Capítulo 4 - Estudios en suelos crónicamente expuestos a glifosato: Caracterización fisicoquímica y microbiológica, y aislamiento de microorganismos tolerantes para llevar a cabo procesos de rizorremediación .....</b>	<b>97</b>
4.1 Introducción .....	98
4.2 Materiales y métodos .....	102
4.2.1 Procedimiento de toma de muestra .....	102
4.2.2 Caracterización fisicoquímica de los suelos.....	104
4.2.3 Procesamiento de muestras para análisis biológicos .....	105
4.2.3.1 Muestras de rizosfera-rizoplana .....	105
4.2.3.2 Muestras de Suelos.....	106
4.2.3.3 Conservación de muestras compuestas .....	106
4.2.4 Cultivos de enriquecimiento para la obtención de microorganismos degradadores y tolerantes a glifosato.....	108
4.2.4.1 Cultivos de enriquecimiento .....	108
4.2.4.2 Aislamiento de microorganismos .....	108
4.2.4.3 Conservación de los microorganismos .....	109
4.2.5 Recuento de microorganismos heterótrofos totales en muestras compuestas.....	109

4.2.6 Asilamiento de ADN de distintas muestras compuestas .....	110
4.2.7 Análisis las comunidades microbianas en muestras de suelo y de rizosfera-rizoplana .....	110
4.3 Resultados y discusión .....	112
4.3.1 Caracterización fisicoquímica de los suelos .....	112
4.3.2 Toma de muestra y aislamiento de microorganismos .....	113
4.3.3 Recuento de microorganismos heterótrofos totales en muestras compuestas .....	115
4.3.4 Estudios de las comunidades microbianas .....	117
4.4 Conclusiones .....	122
4.5 Referencias .....	124
S4.1 Material suplementario .....	128
S4.1.1 Medio mínimo basal con glifosato como única fuente de carbono (MSB-Gly) .....	128
S4.1.2 Medio R2A .....	129
<b>Capítulo 5 - Identificación, caracterización y análisis genómico de microorganismos tolerantes a glifosato .....</b>	<b>130</b>
5.1 Introducción .....	131
5.1.1 Bacterias tolerantes a glifosato .....	131
5.1.2 Bacterias que degradan glifosato .....	132
5.1.3 Bacterias con capacidad de promoción de crecimiento vegetal .....	134
5.2 Materiales y Métodos .....	139
5.2.1 Control de viabilidad de las cepas almacenadas y determinación indirecta del uso del glifosato como nica fuente de fósforo .....	139
5.2.2 Identificación de cepas mediante secuenciación parcial del gen del ARNr 16s .....	139
5.2.3 Estudios in-vitro de capacidad de promoción del crecimiento vegetal .....	140
5.2.3.1 Actividad de ACC-desaminasa .....	140
5.2.3.2 Producción de ácido Indolacético .....	141
5.2.3.3 Producción de acetoina .....	141

5.2.3.4 Solubilización de fósforo inorgánico.....	142
5.2.3.5 Actividad de fitasa.....	142
5.2.3.6 Producción de ácidos orgánicos.....	142
5.2.3.7 Producción de sideróforos.....	143
<b>5.2.4 Determinación de la concentración mínima inhibitoria de glifosato en agar .....</b>	<b>143</b>
<b>5.2.5 Estudios particulares en <i>Ochrobactrum</i> sp. P6BS-III y <i>Rhizobium</i> sp. P44RR-XXIV .....</b>	<b>143</b>
5.2.5.1 Curvas de crecimiento en sistemas de cultivo líquido agitados .....	144
5.2.5.2 Caracterización bioquímica.....	145
5.2.5.3 Secuenciación de genoma completo mediante la plataforma ION TORRENT® .....	145
<b>5.3 Resultados y discusión .....</b>	<b>149</b>
5.3.1 Identificación e investigación de las capacidades de promoción de crecimiento vegetal ....	149
5.3.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de glifosato en agar .....	155
5.3.3. Estudios particulares sobre las cepas <i>Ochrobactrum</i> sp. P6BS-III y <i>Rhizobium</i> sp. P44RR-XXIV .....	156
5.3.3.1 Curvas de crecimiento de cultivos líquidos agitados en aerobiosis.....	157
5.3.3.3 Estudios sobre el genoma de <i>Ochrobactrum</i> sp. P6BS-III .....	161
5.3.3.4 Estudios sobre el genoma de <i>Rhizobium</i> sp. P44RR-XXIV .....	169
<b>5.4 Conclusiones.....</b>	<b>183</b>
<b>5.5 Referencias.....</b>	<b>186</b>
<b>S5.1 Material suplementario.....</b>	<b>197</b>
S5.1.1 Medio rico en nutrientes 869 .....	197
S5.1.2 Medio salino ACC-desaminasa.....	198
S5.1.3 Medio MR VP (test de producción de acetoína) .....	199
S5.1.4 Medio de crecimiento NBRIP (test de solubilización de fosfato de calcio) .....	200
S5.1.5 Medio PSM (test de mineralización de fitatos).....	201
S5.1.6 Medio ST (test de producción de ácidos orgánicos) .....	202

S5.1.7 Medio 284 (Test de producción de sideróforos) .....	203
S5.1.8 Determinación de la concentración mínima inhibitoria de glifosato en agar. Resultados individuales .....	205
<b>Capítulo 6 - Estudios de interacción planta-microorganismo .....</b>	<b>206</b>
6.1 Introducción .....	207
6.2 Materiales y Métodos .....	209
6.2.1 Ensayos de inoculación en placas verticales.....	209
6.2.2 Estudios de microscopía.....	210
6.2.2.1 Conjugación de cepas bacterianas.....	210
6.2.2.2 Estudios de microscopia confocal laser .....	211
6.2.2.3 Estudios de microscopia electrónica de barrido (SEM) .....	212
6.2.3 Ensayo de microcosmos .....	212
6.3 Resultados.....	215
6.3.1 Ensayos de inoculación en placas verticales.....	215
6.3.2 Estudios de microscopía.....	216
6.3.3 Ensayo de microcosmos .....	221
6.4 Conclusiones.....	227
6.5 Referencias .....	229
S6.1 Material suplementario.....	231
S6.1.1 Medio Gamborg B5 .....	231
S6.1.2 Medio de inoculación Líquido.....	232
S6.1.3 Comparación de perfiles de ARISA de las cepas utilizadas en el ensayo de microcosmos y los perfiles de ARISA correspondientes a las muestras originales de las cuales fueron aisladas.....	233
<b>Capítulo 7 - Conclusiones generales y perspectivas a futuro.....</b>	<b>234</b>
7.1 Conclusiones generales y perspectivas a futuro .....	235

---

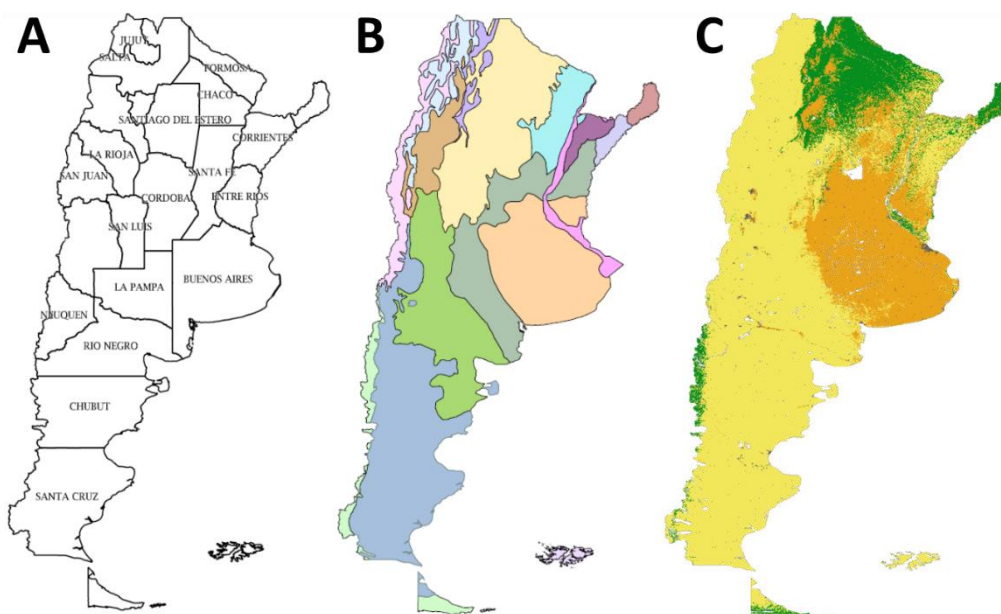
# Capítulo 1 - Antecedentes

---

## 1.1 La Pampa Húmeda Argentina

### 1.1.1 Generalidades de la ecorregión Pampeana

La Pampa Húmeda Argentina es la principal región agrícola del país y una de las regiones de actividad agrícola-ganadera más importantes de Sudamérica. Abarca aproximadamente 52 millones de hectáreas, de las cuales la mayoría se dedican al cultivo de cereales y granos (Viglizzo et al., 2001). Es una extensa llanura cuyos límites están definidos por la isohieta de 600 mm hacia el oeste y sur, el océano atlántico hacia el este, y el bosque chaqueño hacia el norte. Está integrada por las provincias de Buenos Aires, el centro y sur de la provincia de Santa Fe, el sureste de la provincia de Córdoba y el este de la provincia de La Pampa (Figura 1.1). A veces también es incluido el sur de la provincia de Entre Ríos. El clima es templado; las temperaturas medias de verano oscilan entre los 20 y 25 °C y las de invierno entre los 5 y los 12 °C con un promedio anual de 17 °C. Basados en los patrones geográficos, características del suelo, productivos y climáticos, la Pampa Húmeda se subdivide en las siguientes subregiones (Matteucci, 2015): Pampa ondulada, Pampa mesopotámica, Pampa deprimida, Pampa interior y Pampa austral.



**Figura 1.1.** (A) Mapa político de la República Argentina. (B) Ecorregiones de la República Argentina, en donde se distingue en naranja pálido la región Pampeana. (C) Distintos tipos de cobertura de suelo durante el quinquenio 2007-2012, donde se distingue en color naranja a aquellos destinados al uso de cultivos o pasturas naturales. Fuente: Portal de datos abiertos del Ministerio de Agroindustria de la Nación (<https://www.agroindustria.gob.ar/datosabiertos/>).

La Pampa ondulada es la subregión que se encuentra limitada al norte con el río Carcarañá, al este con la margen derecha de los ríos Paraná y de La Plata, la isohieta de 600 mm al oeste y Punta Indio al sur. Se caracteriza por presentar ondulaciones provocadas por valles fluviales amplios y superficiales. Posee suelos de gran profundidad y con buen drenaje, con precipitaciones anuales de aproximadamente 1000 mm, que permiten desarrollar dos ciclos de cultivos en la misma estación de crecimiento. Posee una muy buena red de comunicación vial (destacan la red de autopistas Córdoba-Rosario-Buenos Aires-La Plata, punto neurálgico de comunicación del Mercosur), es la subregión más industrializada y de mayor densidad demográfica.

La Pampa mesopotámica está incluida dentro de la provincia de Entre Ríos, con suelos de profundidad media, de texturas francas a franco-limosas en el oeste y franco-arcillosas en el este, con bajos niveles de infiltración. La red de drenaje se encuentra bien desarrollada, con numerosos cursos de agua de carácter exorréico (Sluijs, 1971). Las actividades económicas de la región son la agricultura (trigo, maíz, arroz, girasol, frutales) en el este y la ganadería en el centro-oeste.

La Pampa deprimida corresponde al área de influencia de la cuenca del río Salado, dentro de la provincia de Buenos Aires. Con grandes dificultades para el drenaje y escurrimiento de aguas superficiales, que ocasiona inundaciones frecuentes. Posee una gran cantidad de lagunas, arroyos y canales. Por sus características edáficas de anegabilidad, alcalinidad y sodicidad superficiales y subsuperficiales, la actividad agrícola en esta subregión se encuentra limitada al cultivo de trigo y pasturas principalmente en las lomadas, siendo la ganadería la actividad predominante. De todas subregiones, la Inundable es la que presenta un menor grado de reemplazo del sistema original de pastizales (Viglizzo et al., 2001).

La Pampa interior, también llamada Pampa central o Pampa alta, es la región que se encuentra limitada por a las sierras Cordobesas al norte, al sur por la Pampa deprimida, la isohieta de 600 mm como límite occidental y Pampa ondulada como límite oriental. Comprende las provincias de Córdoba, La Pampa, Buenos Aires y Santa Fe. De paisaje ligeramente ondulado y drenaje poco definido, presenta lagunas permanentes o temporarias, con amplias zonas afectadas por la salinización. Los suelos de las partes altas muestran poca diferenciación de horizontes, son profundos, neutros y débilmente estructurados. Se desarrollan en la región actividades tanto agrícolas como ganaderas, con grandes áreas bajas de pastizales utilizadas para ganadería, y zonas de lomas utilizadas para la agricultura (Viglizzo et al., 2001)

La Pampa austral está situada al sur y suroeste de la provincia de Buenos Aires. Posee suelos de buena calidad, buenas condiciones de escurrimiento e infiltración, provistos de materia orgánica y



nutrientes minerales, con buenas características texturales y estructurales. Incluye además el litoral marino del Mar Argentino (Océano Atlántico Sur) y las formaciones serranas de Tandilia y Ventania.

Además de contar con un régimen de precipitaciones y un clima benigno, la calidad de los suelos presentes en la Pampa Húmeda es también responsable de su fertilidad. Desde el punto de vista taxonómico, se pueden encontrar tres tipos de suelos: Molisoles (altamente predominantes), Alfisoles (en la subregión de la Pampa deprimida), y Vertisoles (suelos de la margen derecha del Río de La Plata y Pampa mesopotámica) (Panigatti, 2010; Imbellone et al., 2015). Los Molisoles son generalmente suelos minerales típicos de llanuras con horizonte superficial muy oscuro, coloreado y rico en bases. Poseen epipedión mólico (horizonte superficial relativamente grueso, oscuro y rico en humus, en el cual los cationes divalentes dominan el complejo de intercambio, siendo su grado de estructura de media a fuerte). Su alto contenido en materia orgánica constituye el factor predominante para la explotación agrícola.

### **1.1.2 Desarrollo histórico de la Pampa Húmeda Argentina**

La constitución de la Pampa Húmeda como la región agrícola ganadera del país fue un proceso gradual, cuyo ritmo estuvo marcado por las tónicas de los países centrales, puesto que sus necesidades y estrategia geopolítica dictaron el modo y condiciones del comercio de los productos allí producidos, así como el grado de tecnificación alcanzada. Lombardo, (2014) hace un análisis del desarrollo de la región Pampeana desde la perspectiva de los cambios tecnológicos allí ocurridos, e identifica 5 períodos históricos. A continuación, expongo un resumen de estos períodos haciendo especial énfasis en la producción agrícola en el contexto de adopción de las tecnologías:

El primer período es el llamado *“proceso colonial y de transición”* transcurrió desde el siglo XVI hasta 1860 y consistió en un escaso desarrollo económico, basado en economías regionales de carácter primario y destinadas al autoabastecimiento, y no a la exportación. Por ello, no existieron cambios tecnológicos significativos en el terreno hasta la apertura del puerto de Buenos Aires al comercio exterior, lo que significó un aumento de la actividad ganadera, y por lo tanto el primer uso productivo de esta región fértil, que fue el pastoreo. Ferrer (2004) menciona que en ese período se conformaron las primeras estancias como unidades productivas y administrativas, se adaptó el sistema de crianza (rodeos) donde se introdujeron nuevas razas de bovinos, se incorporaron alambrados y se desarrolló la industria del tasajo, necesaria para exportar los productos cárnicos. La producción de granos continuó orientada al mercado interno.

El segundo período es el que sentó las bases de la República como productor mundial de alimentos, el *“período agroexportador”*, que transcurrió entre los años 1860 a 1930. Esta etapa está marcada por la revolución industrial en Europa, que trajo profundos cambios en la organización de las estructuras productivas de los países a nivel mundial. Para Argentina, esto significó la consolidación de su rol como exportador de alimentos. La región pampeana tuvo un gran crecimiento en la productividad a expensas de la expansión de tierras fértiles. El aumento de la inversión extranjera, mayoritariamente inglesa, resultó en un gran desarrollo de infraestructura necesaria para el acopio y transporte de cereales y oleaginosas. Esta combinación de demanda e inversión produjo un fuerte incremento en las exportaciones de maíz, trigo, lino, carnes y lanas y puso a la Argentina como uno de los principales países exportadores a nivel mundial. Las mejoras para el agro se basaron en la incorporación del sistema de rotación agricultura-ganadería, incorporación de maquinaria agrícola importada (tractores, arados, segadoras, etc.), sumado a la mano de obra especializada proveniente de la inmigración europea. Este período no significó un incremento tecnológico relevante respecto al mejoramiento de semillas ni utilización de fitosanitarios. El aumento de rendimiento se basó en el incremento de tierras cultivadas y en la mecanización.

El tercer período, transcurridos entre los años 1930 y 1960, es conocido como *“estancamiento del agro pampeano”*, que, como su nombre lo indica, fue un período marcado por la caída en las exportaciones y en el producto bruto agropecuario, debido a la crisis económica del 30' en un principio y luego, el desarrollo y las consecuencias que tuvo la segunda guerra mundial. Este período se caracterizó por un cambio en la política económica, que pasó del modelo agroexportador a la sustitución de importaciones. El mejoramiento de semillas e incorporación de fitosanitarios sufrió también un proceso de atraso tecnológico durante este período, no solo por la caída en la demanda, sino también por la falta de inversión de capitales e incorporación de tecnología clave, que era importada (maquinaria, agroquímicos, etc.). Es así como en la década del '50 se toman una serie de medidas para incentivar el sector agrícola, como la fabricación de maquinaria agrícola, instalación de filiales de empresas extranjeras y creación del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), así como también del surgimiento de la industria privada de producción de semillas y agroquímicos y la Asociación Argentina de Consorcios Regionales de Experimentación Agrícola (AACREA).

El cuarto período es la consecuencia de la reestructuración productiva que ocurre hacia el final del período anterior, y es llamado *“proceso de modernización”*, que transcurre desde los años 1960 a los años 1990, y que volvió a llevar a la Argentina niveles récord de exportaciones de productos primarios. Éste fue un período de grandes transformaciones tecnológicas, en donde de Obschatko (1988), define las más importantes como: la producción especializada de cinco cultivos que aportarían

el 90% de la producción agrícola (trigo, maíz, sorgo, soja y girasol) junto con la innovación tecnológica correspondiente a cada cultivo; mecanización total de tareas; alto grado de difusión de herbicidas (pre y post emergencia) además de nuevas formas de aplicación; incorporación de fertilizantes de trigo; mejoramiento de instalaciones de almacenaje y secado de granos; mejoramiento y especialización en el manejo de la empresa agrícola y surgimiento de nuevas conductas y formas de organización empresarial. En estos años, el valor de la producción se triplicó, se duplicó la productividad de la tierra, y se triplicó la productividad de la mano de obra. El golpe de estado del año 76' terminó con esta dinámica para instalar el modelo neoliberal, que significó el fin del desarrollo en el sector, deteniendo el proceso de incorporación de nuevas tecnologías. En la década del 80' la soja se consolidó como el cultivo mayoritario. Este cultivo requiere la incorporación de un paquete tecnológico basado en gran parte en la aplicación de agroquímicos, sobre todo los post emergentes, que eran producidos en el extranjero. También se comienza con la incorporación de la siembra directa, cuya práctica requiere un gran uso de agroquímicos (el rol del glifosato en la siembra directa será discutido en la sección 1.2.1). Es en este período en donde factores como el monocultivo (Roccatagliata, 1992), el desarrollo de nuevos agroquímicos (entre los que se encuentra el glifosato) por países centrales (y posterior incorporación en nuestro país como parte de una estrategia productiva y en forma de paquete tecnológico), la adopción de la siembra directa como método de labranza y un contexto internacional de fuerte demanda de granos (que produce el aumento de la superficie sembrada por sobre la dedicada a la ganadería), generan un incremento sustancial en el uso de agroquímicos.

El quinto y último período transcurre desde la década del 90' hasta el presente, llamado "*de profundización de la agriculturización*" o "*agriculturización de la economía*", y se basó en la incorporación de la soja transgénica a partir de 1996, la siembra directa y el consecuente aumento de uso de agroquímicos. Se simplificó al máximo la maquinaria necesaria, así como el modelo de negocio, aumentando la productividad del cultivo, pero disminuyendo la mano de obra (que implica un despoblamiento territorial) y la diversificación de tareas (con las consecuencias negativas que trae la práctica intensiva del monocultivo). Con la incorporación de la soja transgénica resistente a glifosato, los agroquímicos, de la mano del glifosato principalmente, alcanzan su máximo nivel de uso. Se desarrollan también los *pools* de siembra y se promueve el arrendamiento de campos. Esto trae como consecuencia una reducción del número de explotaciones agropecuarias, concentrando la producción en establecimientos más grandes (Mikkelsen, 2008; Reboratti, 2010).

El clásico modelo de rotación de cultivos con pasturas y forrajeras anuales fue reemplazado a comienzos de este siglo por aquel de intensificación agrícola. En este nuevo esquema productivo, los animales sufren un proceso de engorde a corral (llamado *Feed-lot*), mientras que la agricultura tiende

a la implementación del doble cultivo anual, trigo en invierno y soja en verano en el mismo lote (Pengue, 2014). Para sostener los cambios de productividad y la especialización sectorial, son necesarios más insumos, y se generan más residuos y desechos que afectan al ambiente (nutrientes, aguas residuales, plaguicidas, antibióticos, etc.). La agricultura argentina en general –y la pampeana en particular– se ha expandido en los últimos 20 años dentro de una matriz tecnológica moderna enmarcada por cultivos transgénicos, siembra directa, mayor uso de fertilizantes y plaguicidas y, en menor medida, por prácticas asociadas a la agricultura de precisión (Satorre, 2005).

### **1.1.3 Las consecuencias de la profundización de la agriculturización**

La profundización del modelo agrícola productivo hacia finales del siglo pasado, y que continúa hasta nuestros días, trajo aparejado complejos cambios sociales, económicos, tecnológicos y ambientales.

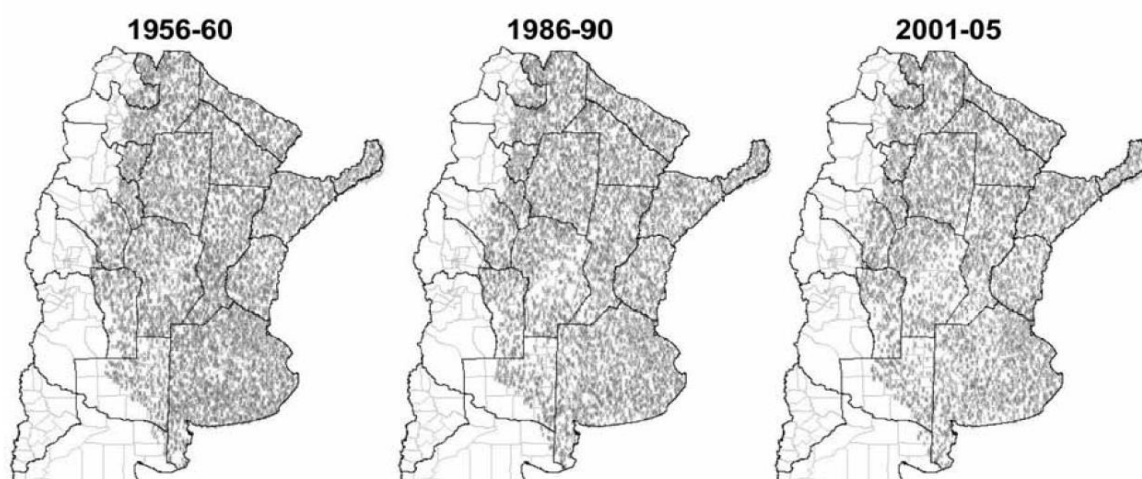
La actitud positiva con respecto a la adopción de tecnologías (vinculadas al uso de semillas transgénicas, siembra directa y almacenamiento de granos), en un sector que históricamente se mostró conservador, destaca como aspecto positivo, junto con los aumentos en rendimientos y precios internos de los granos, que llevaron la producción a un alto nivel de competitividad a nivel global (Reboratti, 2010). En este sentido, la soja precisa menor cantidad de combustible y fertilizantes que otros cultivos, y su implementación es más simple debido a que la siembra directa utiliza menor cantidad y tipos distintos de maquinaria (Albanesi, 2005). Es así como Argentina es uno de los principales exportadores de aceite y harina de soja y, se ubica también en lugares relevantes en el comercio de grano de soja, maíz y trigo (Daza et al., 2016). De acuerdo con estadísticas del INDEC (Instituto Nacional de Estadística y Censo), en el año 2016, los complejos exportadores oleaginosos y cerealeros representaron el 31,4% y el 13,2% de las exportaciones, respectivamente. Solamente la venta de soja representó un 30% de las exportaciones ese mismo año (unos 17.310 millones de dólares). El sector agrícola ganadero en general, representa el 57.6% del total de exportaciones.

Entre las consecuencias negativas frecuentemente discutidas, se mencionan:

- La concentración de la tierra. Este sistema de cultivo presenta una economía de escala, es decir que los costos unitarios disminuyen a medida que incrementa la producción. Esto genera un aumento en la demanda de superficies cultivables de mayor tamaño que las utilizadas por cultivos y métodos de labranza tradicionales. El surgimiento de *pools* de siembra, el arrendamiento y la

pérdida de la diversificación tienen como consecuencia la desterritorialización regional o “éxodo rural”.

- Los márgenes de rentabilidad que el paquete tecnológico ofrece producen el desplazamiento de cultivos y actividades pecuarias tradicionales de la región, provocando la expansión de la frontera agrícola. Esto tiene, entre sus consecuencias más importantes, los desmontes y la pérdida de biodiversidad producto de la destrucción de áreas naturales.
- Compromiso con garantizar una soberanía alimentaria, por la dependencia que implica la concentración de la economía en los grandes productores, en las empresas fabricantes de insumos y en las exportadoras, que frecuentemente son de capitales transnacionales. Los pueblos soberanos tienen el derecho a poder decidir qué consumir, pero también deben definir cómo y quiénes producen los alimentos, controlando su propio sistema alimentario y productivo.
- Cambios en la calidad de suelo, principalmente producto de una disminución de la fertilidad (Robertson & Vitousek, 2009) y aumento de la erosión. La rotación con otros cultivos y la alternancia con períodos de descanso fueron estrategias que tendieron a minimizar este efecto, aunque en los últimos años, los márgenes económicos y el arrendamiento dificultaron la posibilidad de este tipo de manejos (Reboratti, 2010). Como consecuencia, y a pesar de que las prácticas de fertilización sean usuales, no logran compensar esta pérdida de nutrientes (García & González, 2015), reponiéndose sólo un 43% del nitrógeno, 70% del fósforo, 50% del azufre y 2%



**Figura 1.2.** Evolución del stock de fósforo disponible en las zonas cultivables durante la segunda mitad del siglo pasado y el primer quinquenio del siglo actual. Siendo la intensidad de coloración en cada punto en el mapa un reflejo de la cantidad de fósforo disponible para un determinado establecimiento, se puede observar como esta disminuye a lo largo de los años. Imagen gentileza del autor (Viglizzo & Jobbágy, 2010).

del potasio exportado en soja. Viglizzo y Jobbágy (2010) ilustran el cambio en las reservas de fósforo disponibles (Figura 1.2).

- Aspectos relacionados con el uso generalizado de agroquímicos. El análisis de las consecuencias que trae aparejado el incremento en el uso de agroquímicos adquiere tres dimensiones diferentes: la pérdida de biodiversidad, el aumento de resistencia en malezas y aumento de riesgo de contaminación. En la Tabla 1.1 se puede observar la cantidad total de agroquímicos utilizados anualmente en nuestro país y, de manera diferenciada, el porcentaje del total que corresponde a herbicidas.

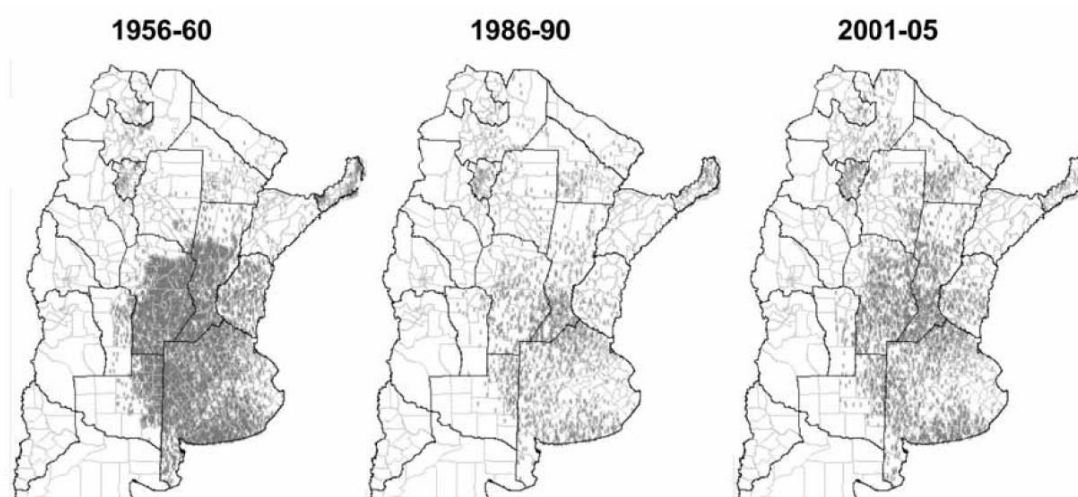
**Tabla 1.1.** Evolución del mercado de fitosanitarios y representación de productos herbicidas en las últimas tres décadas.

	Año						
	1991	1993	1995	1997	1999	2001	2003
<b>Fitosanitarios totales (millones de kg o L)</b>	39,2	50,3	72,4	123,8	127,5	142,3	198,5
<b>Porcentaje de herbicidas sobre el total (%)</b>	50,1	52,1	57,9	60,9	76,4	78,5	80,1
	Año						
	2005	2007	2009	2011	2013	2015	2016
<b>Fitosanitarios totales (millones de kg o L)</b>	234,2	254,1	260,5	335,9	281,7	274,4	310,0
<b>Porcentaje de herbicidas sobre el total (%)</b>	77,3	78,1	77,0	75,0	72,0	86,8	87,0

El aumento sustancial en el uso de herbicidas, sobre todo de glifosato, produjo cambios en el perfil de malezas típico de la región, principalmente reduciendo la cantidad de dicotiledóneas anuales (de la Fuente et al., 2006). Se registró también un incremento en la diseminación de especies leñosas asociadas a la práctica de la siembra directa (Ghersa et al., 2002). Los bordes de vegetación natural y nichos biológicos fueron reducidos, producto de la intensificación agrícola, de la no selectividad del glifosato y del uso de germoplasma transgénico.

En las últimas dos décadas se registró un aumento en la aparición de malezas tolerantes a herbicidas en nuestro país, así como también en América Latina y en el mundo (Powles et al., 2008; Valverde, 2010; Vila-Aiub et al., 2008), tendencia que actualmente genera preocupación tanto en el ámbito público como privado (Carpenter & Gianessi, 2010). Entre las especies informadas en nuestro país por la *Red de conocimiento de malezas resistentes* de la *Asociación Argentina de Productores en Siembra Directa* (Aapresid), se encuentran la rama negra (*Conyza bonaerensis*), sorgo del Alepo (*Sorghum halepense*) y dos tipos de raigrás (*Lolium multiflorum* y *L. rigidum*), el capín (*Echinochloa colona*), la grama pata de ganso (*Eleusine indica*), la gramilla dulce (*Cynodon hirsutus*), el yuyo colorado (*Amaranthus quitensis* y *A. palmeri*), todas resistentes a glifosato, la avena negra (*Avena fatua*) resistente a graminicidas ariloxifenoxipropiónicos (FOP) y el nabón (*Raphanus sativus*) resistente a inhibidores de ALS.

A lo largo de los últimos 50 años, y como parte de una tendencia mundial, nuestro país sufrió un cambio gradual que consistió en el reemplazo de agroquímicos por aquellos que presentaran menor toxicidad y persistencia. Esto implicó una reducción del riesgo de contaminación hacia finales del siglo pasado. Tendencia que se revirtió con el modelo imperante, en donde el riesgo por contaminación con plaguicidas se incrementó de la mano del aumento de la superficie cultivada, de la proporción relativa de soja y cultivos asociados a soja, y otros cultivos transgénicos (Viglizzo & Jobbágy, 2010).



**Figura 1.3.** Riesgo estimado de contaminación por plaguicidas en las zonas cultivables durante la segunda mitad del siglo pasado y el primer quinquenio del siglo actual. Imagen gentileza del autor (Viglizzo & Jobbágy, 2010)

En la figura 1.3 puede observarse lo anteriormente mencionado. La ecuación utilizada para obtener el valor en unidades relativas expresa el riesgo de contaminación de acuíferos en función de las características fisicoquímicas de los agroquímicos utilizados, su toxicidad, persistencia y movilidad en suelo. También se tuvo en cuenta la formulación de cada agroquímico y el proceso productivo en el que se encuentra involucrado. Surge de este análisis, también como resultado, que la producción de soja es el cultivo que más riesgo asociado posee (Viglizzo & Jobbágy, 2010).

Debido a sus condiciones agroecológicas, a su estructura productiva y grado tecnológico actual, Argentina es uno de los cuatro lugares del mundo más aptos para expandir la oferta de alimentos (Agroindustria, 2017). En un contexto en el cual se proyecta que la demanda de alimentos y otros productos agrícolas aumentará en casi un 50% mundialmente entre 2012 y 2050 (Liu, 2017), y amparados por una evolución favorable de los precios de los *commodities*, alto grado de competitividad tecnológica y una fuerte representación en la economía global, los esfuerzos del país en las siguientes décadas se enfocarán en la intensificación del uso de la tierra por medio de la apropiación de nuevas y más eficientes tecnologías, en donde se hará un uso más razonable de insumos, de forma de minimizar el impacto ambiental (Agroindustria, 2017).

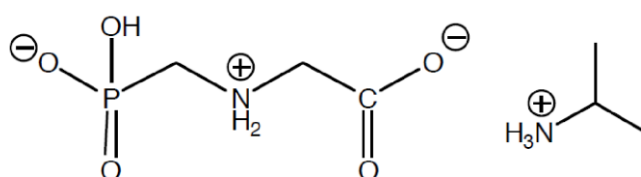
Nos encontramos entonces con un sector de nuestro país de gran relevancia histórica, económica y social, dispuesto a transitar nuevamente un período de expansión y transformación productiva, en las que existe una necesidad real de incluir soluciones que ayuden a mitigar el impacto ambiental de las prácticas actuales de producción agrícola. La problemática del uso de agroquímicos y su consecuencia en el medio ambiente y la salud humana debe ser abordada desde la perspectiva de brindar herramientas biotecnológicas que, al ser incorporadas, permitan al productor agropecuario continuar con el desarrollo de sus actividades sin perder rentabilidad y, a la vez, sean eficaces en la mitigación del impacto que causa el uso intensivo de estos productos. Entre los agroquímicos utilizados, el glifosato supera el 60% del total de productos fitosanitarios utilizados en el país y es, desde hace tiempo, foco de polémicas y motivo de gran preocupación.



## 1.2 El herbicida glifosato

### 1.2.1 Generalidades sobre el herbicida glifosato

El glifosato, N-(fosfonometil)-glicina es un ácido débil, conformado por el aminoácido glicina, a cuyo grupo amino se encuentra unido un grupo fosfonometilo (Figura 1.4). En su forma pura, es un sólido cristalino, de color blanco, incoloro e inodoro. Suele sintetizarse comúnmente como sal de sodio, amonio, o isopropilamina.



**Figura 1.4.** Estructura química de la sal de isopropilamina de la N-(fosfonometil)-glicina.

La molécula N-(fosfonometil)-glicina fue sintetizada por primera vez en el año 1950 en los laboratorios la empresa farmacéutica suiza Cilag, por el Dr. Henri Martin. Cuando la empresa es adquirida en 1959 por Johnson & Johnson, la nueva dirección decide vender aquellas muestras de investigación sin interés farmacológico, entre las que se encontraba el glifosato, a la empresa Aldrich Chemical Company. Luego Aldrich transfiere el glifosato a la estadounidense Monsanto Company, que estaba en ese entonces interesada en desarrollar moléculas quelantes a base de fosfonatos similares al ácido aminometilfosfónico (AMPA), que funcionasen como ablandadores de agua. Monsanto después comienza a realizar pruebas a estas mismas moléculas sobre su potencial como herbicidas, y es ahí que por primera vez se reporta su actividad sobre malezas perennes. El compuesto fue resintetizado y luego evaluado en ensayos de invernadero. Hacia el año 1971 Monsanto patentó el compuesto (código de patente: US 3799758) y hacia 1974 comenzó a comercializar el primer y más exitoso formulado a base de la sal de isopropilamina, el Roundup® (Dill et al., 2010). En el último año, la empresa alemana Bayer adquirió finalmente a Monsanto por valor de U\$S 62.500.000.000. Se espera que con esta adquisición, Bayer maneje las ventas de un cuarto del negocio global de agroquímicos y semillas (Chee, 2018).

El glifosato inhibe la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS, EC 2.5.1.19), encargada de catalizar la reacción de formación de 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato a partir de shikimato-3-fosfato y fosfoenol piruvato, que constituye un paso clave en la síntesis de los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano (Funke et al., 2006b). Esta enzima se encuentra presente en bacterias, hongos y plantas, y es parte de la ruta metabólica conocida como la vía del shikimato (Maeda & Dudareva, 2012). La evidencia experimental indica que el glifosato actuaría como inhibidor de la enzima EPSPS, formando un complejo ternario ceñido *shikimato-enzima-glifosato*, actuando el glifosato como un análogo del estado de transición de la reacción. Existe una gran similitud estructural entre el glifosato y el derivado del fosfoenol piruvato en el estado de transición durante la catálisis de la enzima, el fosfoenol pirovoil oxonio (Schönbrunn et al., 2001). Además, los sitios de unión del fosfoenol piruvato y el glifosato se solapan. Sin embargo, y si bien la hipótesis del análogo del estado de transición es la más aceptada, evidencia obtenida durante el principio de este siglo indica que el glifosato podría actuar como inhibidor no competitivo con el 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato, hecho que contradice esta hipótesis (Funke et al., 2006a). La inhibición de la EPSPS como único mecanismo de acción permitió la búsqueda de alternativas tolerantes de la enzima para luego desarrollar mediante ingeniería genética, la transfección de especies vegetales con valor productivo.

Una vez que es absorbido por las partes aéreas de la planta, el glifosato es translocado por el floema a todos los tejidos meristemáticos en crecimiento, llevándolo a ejercer su acción sobre aquellas estructuras que generalmente escapan a la aplicación y permiten a la planta volver a crecer, como los rizomas, estolones o bulbos. A esto debe considerarse la vasta gama de especies en la cual es efectivo, ya que, de acuerdo con la ficha técnica actualizada para los Estados Unidos, el producto Roundup® original (Monsanto Company, 2004) es capaz de controlar 111 malezas de hoja ancha y gramíneas anuales, 62 de tipo perenne y 70 especies arbóreas diferentes. Por estas dos deseables cualidades se lo conoce como un herbicida sistémico de amplio espectro, siendo su uso recomendado tanto en entornos urbanos como agrícolas. En ambientes urbanizados es frecuente su aplicación en vías de ferrocarriles, terrenos baldíos, parques y jardines. En agroecosistemas, se utiliza mayoritariamente en el barbecho químico, como aplicación de pre emergencia (asociado a la práctica de siembra directa), en el cultivo de granos con tecnología GR, como aplicación en post-emergencia para la limpieza de zanjas y bordes de los lotes y para desmalezar frutales y viñedos.

Si bien el glifosato tuvo una rápida adopción en su uso como herbicida, como consecuencia de su efectividad y su versatilidad, su demanda aumentó exponencialmente a mediados de la década de los 90, luego del desarrollo de cultivos genéticamente modificados resistentes al glifosato o *Glyphosate*

*Resistant crops* (GR), junto con adopción y posterior sinergia con la siembra directa como método de labranza en los principales países productores de granos.

El primer cultivo GR fue la soja *Roundup Ready*® (RR) de Monsanto patentada en 1996 en los Estados Unidos y autorizada el 25 de marzo de ese mismo año en nuestro país (Padgett et al., 1996). Le siguieron el algodón GR, maíz GR, canola GR, alfalfa GR y remolacha GR (Green, 2016).

La ingeniería genética para el desarrollo de cultivos GR siguió dos estrategias: la expresión de una EPSPS insensible o la inactivación del glifosato.

De acuerdo con Feng y colaboradores (2010), los primeros trabajos de transgénesis consistieron en intentar una sobreexpresión de la EPSPS, aunque no lograron niveles satisfactorios de resistencia. La siguiente estrategia fue generar mutantes de la enzima para de ese modo lograr una pérdida de afinidad de unión del glifosato a la enzima (aumentar la constante de inhibición,  $K_i$ ) sin alterar la afinidad de unión al fosfoenol piruvato (conservar la  $K_m$ ). Si bien se lograron obtener algunas mutantes que cumplieron este objetivo, el aislamiento de una cepa bacteriana tolerante a glifosato, el *Agrobacterium* sp. CP4, proveniente del efluente de una empresa fabricante del herbicida, resultó ser muy superior a cualquier mutante desarrollada hasta el momento. El primer desarrollo comercial transgénico, consistió entonces en la expresión de la enzima insensible CP4 EPSPS en soja, la que actualmente forma parte de transgénicos de diferentes cultivares comerciales, si bien existen otras alternativas disponibles como la mEPSPS y 2mEPSPS, que son EPSPS mutantes de *Zea mays* (Yadava et al., 2017).

Por otro lado, también se llevaron a cabo desarrollos para obtener cultivos GR mediante la inactivación de glifosato en el tejido vegetal, expresando glifosato oxidasa (GOX) proveniente de una especie bacteriana del género *Ochrobactrum* para transformar glifosato a AMPA (Barry et al., 1992) o glifosato acetiltransferasa (GAT) (Castle et al., 2004), para transformar el glifosato en N-acetil glifosato, aunque actualmente ninguna de las dos estrategias es utilizada comercialmente *per se* (existe una variedad de colza que posee dos casetes de expresión, uno conteniendo el gen de *cp4 epsps* y el otro el gen de *gox*) (Que et al., 2010).

El desarrollo de eventos transgénicos para conferirle a cultivos de destacada importancia económica resistencia a glifosato fue sin lugar a dudas, un hecho revolucionario para la agricultura, transformando el laboreo de forma radical, brindando al agricultor la posibilidad de aplicar glifosato del lote en presencia de un cultivo en post-emergencia. Si le sumamos a esto el hecho de que el herbicida es de amplio espectro y sistémico, esto implicó un aumento en la productividad muy grande y, por ende, una rápida adopción y difusión de esta tecnología.

Merece destacarse también, y como práctica fundamental que se vale del glifosato como principal insumo, la incorporación de la siembra directa al modelo de producción agrícola. La siembra directa o “labranza 0” implica la siembra de granos sin necesidad de arar previamente el terreno. El uso de esta tecnología tiene como principales ventajas mejorar el aprovechamiento del agua, proteger contra la erosión, mejorar el balance de la materia orgánica y minimizar el uso de combustibles y generación de emisiones contaminantes, reduciendo la cantidad de maquinaria utilizada. Durante los períodos de descanso entre siembras, llamados barbecho, ocurre un gran crecimiento de malezas producto de un incremento en la disponibilidad de agua, por no practicarse el arado. Estas deben ser controladas con una combinación de herbicidas previo a la nueva siembra, y es en este punto en donde el glifosato es utilizado en grandes cantidades (Altieri & Pengue, 2006)

Los formulados, término que se usa para referirse a las distintas presentaciones comerciales del producto, están constituidos por el glifosato (principio activo), surfactantes y agua. El glifosato, como se aclaró anteriormente, se encuentra como el contraión de diferentes cationes (isopropil amina, amonio, diamonio, dimetil amonio, potasio, sesquisodio y trimesio), a la vez que se incorpora en diferentes proporciones según el producto comercial, pudiendo encontrarse preparados que van desde 13,5 % p/v hasta 95 % p/p, siendo las concentraciones más comúnmente usadas las de 39,2 % v/v, 48,0 % v/v y 75,7 % p/v. Los surfactantes son moléculas con capacidad tensioactiva, y tienen la función de facilitar la absorción del herbicida frente al contacto con las malezas. Representan generalmente hasta un 15% del formulado. El surfactante no iónico más utilizado en las formulaciones es la “amina de cebo” polietoxilada, o mejor conocido en inglés, polyethoxylated tallow amine (y referido en la bibliografía por sus siglas, POEA), que es un preparado derivado de ácidos grasos animales mezclados con alquilaminas polietoxiladas de cadena larga. La POEA actúa sinérgicamente con el glifosato incrementando su toxicidad respecto al grado técnico, hecho de gran relevancia que ha sido tenido en cuenta en varios estudios ecotoxicológicos (Tsui & Chu, 2003).

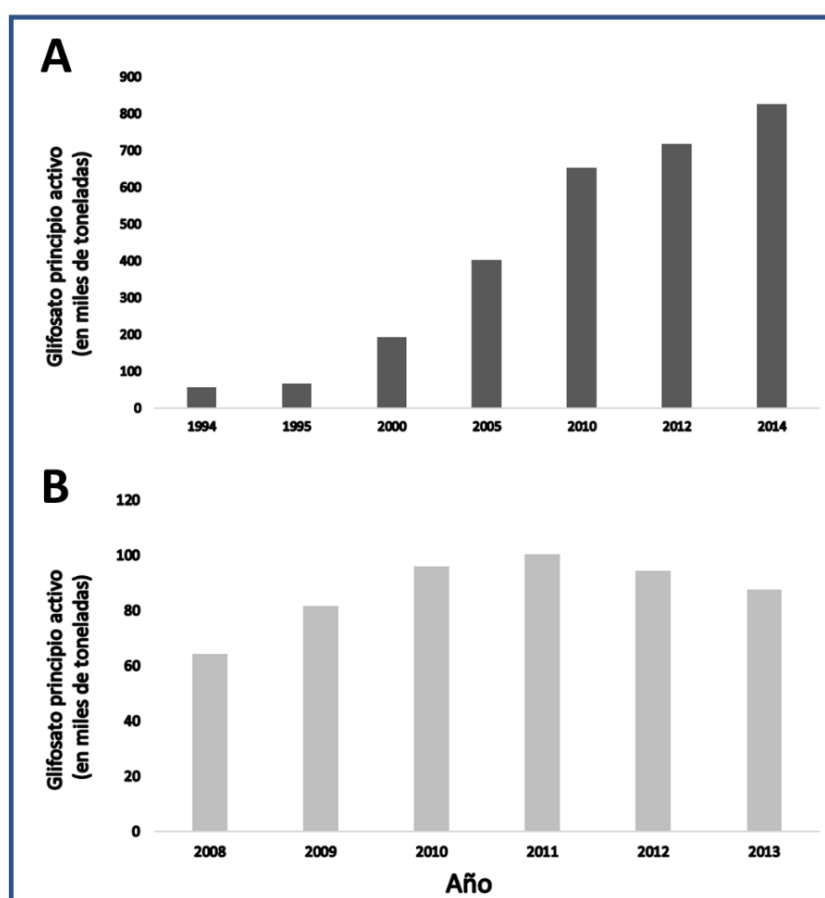
En la Argentina, el último informe de mercado disponible de glifosato es del año 2013, y pertenece a la Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes (CASAFA), una asociación empresaria que representa a la industria de la ciencia de cultivos y a sus empresas socias, que componen aproximadamente el 90% del mercado, y de la que se valen organismos gubernamentales y no gubernamentales para el análisis del consumo y facturación de fitosanitarios en el sector agroindustrial (Pórfido & Butler, 2014). Resulta conveniente comparar las cantidades de este período con aquellas presentadas por Benbrook (2016), cuyo trabajo trata sobre la estimación del consumo de herbicidas a base de glifosato en Estados Unidos y en el Mundo. En la Argentina, la cantidad de agroquímicos a base de glifosato empleados en el 2013 fue de 182.484 toneladas (tanto líquidos como

sólidos), representando un 65% del total de herbicidas utilizados. Si consideramos una concentración promedio de principio activo de 48%, estamos hablando entonces de un total de 87.592 toneladas de principio activo. Para el año 2014, el estimado global de consumo de principio activo fue de 825.804 toneladas, mientras que en Estados Unidos fue de 125.384 toneladas. Esto ubica a nuestro país como el consumidor de aproximadamente el 10% del glifosato a nivel mundial. El análisis del consumo global revela un aumento de consumo exponencial luego de la incorporación de cultivos GR, indicando la adopción de la práctica en post-emergencia mencionada anteriormente. La adopción de la siembra directa en Sudamérica, el aumento de la cantidad de cultivos comerciales resistentes a glifosato y la reducción en los costos de producción del equivalente ácido (en parte por el vencimiento de la patente de Monsanto, que incrementó considerablemente la manufactura genérica) contribuyeron también a este salto (Figura 1.5A). Como parte de ese mismo análisis, el autor menciona que, si se tiene en cuenta que la superficie cultivable en el mundo es de 1.400.000.000 hectáreas, con la cantidad de glifosato utilizado durante el año 2014 se llega a la increíble cifra de 0,53 Kg ha<sup>-1</sup> promedio. En la Argentina, puede observarse un consumo constante del agroquímico en el período entre el 2008 y 2013, correlacionado con la profundización de la agriculturización (Figura 1.5B). Si consideramos el principio activo calculado durante la campaña 2013 y la cantidad total de hectáreas de la Pampa Húmeda, el consumo promedio es de 1,68 Kg ha<sup>-1</sup>, triplicando los valores promedio a nivel global.

**Tabla 1.2.** Consumo de glifosato diferenciado por cultivo.

<b>Cultivo</b>	<b>Cantidad (expresada en Kg o L de formulado)</b>	<b>Porcentaje de uso sobre el total de glifosato (%)</b>	<b>Porcentaje de uso sobre el total de agroquímicos utilizados en ese cultivo (%)</b>
Algodón	165.400	0,09	14,9
Barbecho	87.749.980	48,09	75,9
Caña de azúcar	45.998	0,03	2,6
Cítricos	56.737	0,03	4,9
Frutales de carozo	23.874	0,01	4,1
Frutales de pepita	15.916	0,01	2,0
Girasol	412.866	0,23	7,2
Maíz	13.046.260	7,15	44,2
Maní	79.581	0,04	4,1
Pasturas	448.748	0,25	15,3
Poroto	571.338	0,31	41,0
Soja	77.919.260	42,70	76,0
Tabaco	84.14	0,05	24,1
Trigo y cebada	686.625	0,38	8,5
Otros	1.177.483	0,65	36,4
Total	182.484.206	100,00	-

En el informe de CASAFE también se ofrece la información del consumo discriminado de glifosato por cultivo, que se expone en la tabla 1.2. En ella se puede apreciar que el barbecho químico es el proceso que consume mayor cantidad del herbicida, seguido por los cultivos GR como la soja y el maíz. Es importante tener en cuenta que las cantidades totales van a depender del área cultivada de cada cultivo en cada campaña, por lo que debe ser considerado también el porcentaje que ocupa el agroquímico en el paquete de fitosanitarios que recibe cada cultivo individualmente al momento de realizar análisis más exhaustivos y proyecciones a futuro de su consumo.



**Figura 1.5.** Consumo de glifosato a nivel mundial (A) y a nivel local (B). Los datos obtenidos son los últimos disponibles a la fecha de realización de la tesis.

### 1.2.2 Propiedades fisicoquímicas del glifosato y persistencia en suelos

De acuerdo con su estructura química el glifosato presenta naturaleza anfótera, pudiendo existir en 4 formas diferentes con valores de pKa de <2, 2,6, 5,6 y 10,6, y es estable frente a la hidrólisis a pH 3, 6 y 9 a temperaturas de 5 °C y 35 °C (FAO, 2001). Gran parte de las consecuencias ambientales que

produce este agroquímico se relacionan con sus propiedades fisicoquímicas, las que son resumidas en la tabla 1.3.

**Tabla 1.3.** Características fisicoquímicas del glifosato

Propiedad	Compuesto		
	Glifosato ácido	Glifosato isopropilamina	Glifosato Amonio
Punto de fusión (°C)	184,5 (Descompone a 187°C)	-	-
Densidad g cm <sup>-3</sup> (20 °C)	1,704	-	-
Presión de vapor (25 °C) (mPa)	1,31.10 <sup>-2</sup>	2,1.10 <sup>-3</sup>	9.10 <sup>-3</sup>
peso molecular (g mol <sup>-1</sup> )	169,07	228,19	186,11
Solubilidad en agua (mg L <sup>-1</sup> ) (pureza ~100%)	11.6	786.000	144.000
K <sub>H</sub> (atm m <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> )	4,08.10 <sup>-19</sup>	6,27.10 <sup>-27</sup>	1,5.10 <sup>-13</sup>
log Kow	<-3,2	-5,4	-5,32
Absortividad molar (295 nm)	0,086 L mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	-	-
pH (solución 1% p/v en H <sub>2</sub> O dest.)	2,5	-	-
K <sub>oc</sub> mL g <sup>-1</sup>	300 - 20.100	300 - 20.100	300 - 20.100

Es poco soluble en solventes orgánicos y muy soluble en agua, siendo la forma ácida la menos soluble de todas. Presenta valores de constante de Henry y presiones de vapor muy bajas, por lo que los fenómenos de volatilización son de poca relevancia, dejándose de lado en los análisis de impacto ambiental (Franz et al., 1997). El logaritmo del coeficiente de partición octanol-agua (log K<sub>ow</sub>) indica, además de su baja hidrofobicidad, una baja bioacumulación teórica, por lo que todos los formulados requieren necesariamente como aditivo un surfactante. Los coeficientes de adsorción de carbono orgánico (K<sub>oc</sub>), medida de susceptibilidad del compuesto a ser adsorbido en el suelo, presentan una gran variabilidad, pudiendo presentar alta o baja movilidad de acuerdo con el suelo estudiado. Esta variación puede ser atribuida a la composición mineral de los suelos, siendo la materia orgánica poco relevante. Se discutirá en los siguientes párrafos sobre las consecuencias de esta propiedad en los fenómenos de lixiviación.

La adsorción del glifosato a la matriz del suelo ocurre principalmente a nivel de su componente mineral. El contenido de arcillas, óxidos y la capacidad de intercambio catiónico juegan un rol fundamental en la dinámica del herbicida en esta matriz de alta complejidad, siendo el grupo fosfonato presente en la molécula el responsable de mediar las interacciones con metales presentes, formando complejos con ellos (Gimsing et al., 2007). La presencia de los cationes Ca<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup> y Al<sup>3+</sup> en arcillas como la bentonita o montmorillonita, incrementan la capacidad de unión del glifosato a éstas, siendo los metales trivalentes Fe<sup>3+</sup> y Al<sup>3+</sup> aquellos que mayor influencia tienen (Vereecken, 2005). La presencia de óxidos amorfos de aluminio y hierro tienen aún mayor impacto en la adsorción que las arcillas, de acuerdo con Gimsing & Borggaard (2002). Generalmente los suelos

contienen arcillas de diversos orígenes como así también diferentes óxidos de hierro y aluminio, por lo que adsorción final será el resultado de la cantidad y composición de ambos componentes, y por lo que Vereecken (2005) propone utilizar esta caracterización como un indicador mucho más adecuado que la constante  $K_{oc}$ , si bien no propone de qué manera llevarlo a la práctica.

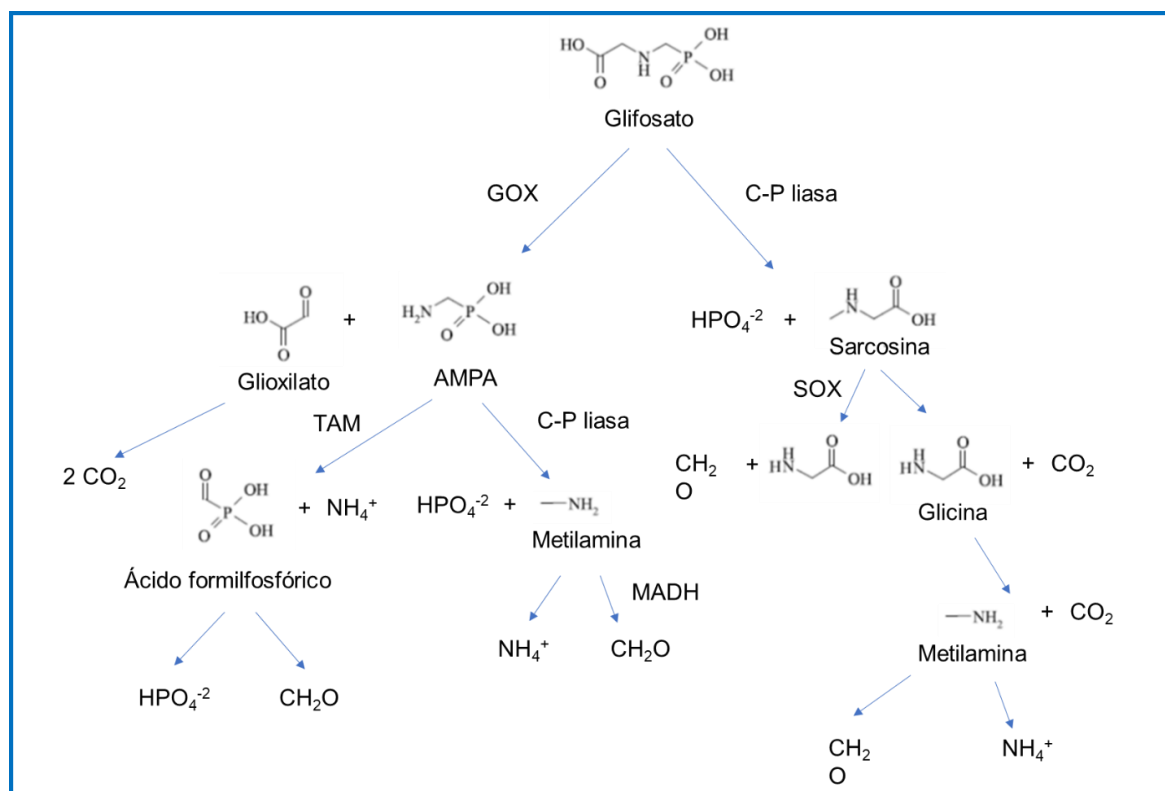
El pH del suelo también es importante, ya que media la carga neta tanto de la molécula de glifosato como de los óxidos, siendo mayor la adsorción del glifosato a menores pH por presentar condiciones electrocinéticas más favorables (Day et al., 1997). Otros dos elementos del componente abiótico del suelo usualmente discutidos en la bibliografía son: el contenido de ácidos húmicos y el contenido de fosfatos. El glifosato también puede adsorberse a ácidos húmicos, siendo un aspecto relevante la estructura macromolecular de los mismos (Piccolo et al., 1996). Los fosfatos compiten con el glifosato por los mismos sitios de unión en el suelo, y también deben ser consideradas tanto las concentraciones de fósforo disponible como los antecedentes de uso de fertilizantes a base de fosfatos, ya que reduciría su adsorción (Gimsing et al., 2007).

Los estudios de movilidad del glifosato en el suelo intentan esclarecer bajo qué condiciones ocurren los fenómenos de percolación y escorrentía, que son los movimientos de agua que transportan el agroquímico hacia fuentes de agua subterráneas y superficiales, respectivamente. Son, por lo tanto, estudios de gran relevancia ambiental. Vereecken (2005) también discute este aspecto, con especial foco en estudios realizados en columnas cargadas con suelo, lisímetros y a escala de campo. Destaca la importancia que tienen las precipitaciones (en cantidad y en el tiempo) y la formación de estructuras macroporosas, grietas, heterogeneidades en el perfil y “efectos embudo” en el suelo, ya que causan flujos preferenciales y aumento de transporte. Estos flujos preferenciales, si bien tienen dirección descendente, repercuten en una mayor ocurrencia del herbicida en aguas de escorrentía que de percolación, y son directamente dependientes de la humedad relativa del lote. Curiosamente, varios estudios indican que no hay diferencias significativas en cuanto a la movilidad del herbicida y la forma de laboreo de la tierra (Fomsgaard et al., 2003; Okada et al., 2016).

El glifosato es degradado mayoritariamente por los microorganismos del suelo, siendo la degradación por otras vías (como la fotólisis o hidrólisis) poco relevantes (Bento et al., 2016). En la figura 1.6 se esquematiza las rutas de degradación del glifosato, con sus respectivos metabolitos. La descomposición del glifosato transcurre por dos vías principales (Schuette, 1998; Sviridov et al., 2015; Székács & Darvas, 2012), en función del grupo químico es hidrolizado primero, el ácido carboxílico o el fosfato, siendo la primer vía catalizada por oxidorreductasas, y la segunda por C-P liasas. Como consecuencia de la primer vía, se obtiene el metabolito AMPA, mientras que como consecuencia de la segunda vía se obtienen los metabolitos sarcosina y fosfato. La ocurrencia de estas vías es



simultánea y sucede tanto en suelos como en agua. En este sentido, la actividad microbiológica del suelo, y por lo tanto la degradación del glifosato, dependerá de parámetros como la temperatura, humedad relativa, aireación y comunidades presentes (Stenrod et al., 2006). Más adelante, se ampliará la discusión sobre la degradación microbiológica de glifosato en los (capítulos 4 y 5 del presente trabajo).



**Figura 1.6.** Vías de degradación del glifosato en suelo.

En un sentido amplio, podríamos decir que la persistencia del herbicida estará dada por el equilibrio entre la adsorción que tenga en el suelo, su estructura, los flujos preferenciales que puedan darle una mayor movilidad y la actividad microbiológica. Esta conjunción de causas, todas ellas complejas *per-se*, determinan que la vida media del glifosato en diferentes suelos varíe desde algunos días hasta más de dos años (Székács and Darvas, 2012).

### 1.2.3 Destino del glifosato y AMPA en suelos de Argentina

En nuestro país se realizaron estudios de adsorción sobre diferentes suelos de origen pampeano y extrapampeanos. Pessagno y colaboradores (2008) trabajaron realizando isotermas de adsorción en suspensiones acuosas de tres suelos diferentes de la provincia de Santa Cruz. Los resultados obtenidos indican que el glifosato formó complejos superficiales con diferentes minerales (goetita, caolinita,

illita, montmorillonita), destacando la influencia del pH, donde la adsorción se vio favorecida a menores valores. También se reporta la preferencia a los óxidos de hierro en la adsorción. Maitre y colaboradores (2008) estudiaron la adsorción a suelos de las provincias de Santa Fe (Argiudol típico) y Entre Ríos (Argiudol ácuico). En este estudio, los autores reportan valores de  $K_{oc}$  de 516 para el Argiudol típico y de 631 para el Argiudol ácuico, lo que podría implicar una cierta movilidad del glifosato. También se reporta una adsorción rápida del herbicida en ambos suelos, con diferencias en la adsorción de la sal de isopropilamina respecto a la forma ácida. En un trabajo utilizando  $^{14}C$ -glifosato, Rampoldi y colaboradores (2014) estudiaron la adsorción y desorción del glifosato, su degradación, y la relación con el manejo agrícola (monocultivo y rotación de cultivos) en tres suelos diferentes de la provincia de Córdoba (Argiudol típico, Haplustol típico y Haplustol éntico). Se observaron cambios en la distribución de la forma adsorbida y soluble en función del tipo de suelo, lo que causó cambios en los patrones de mineralización (degradación). También se observó que el grado de extensión de adsorción del glifosato e histéresis de desorción fue mayor en los suelos bajo rotación que en suelos bajo monocultivos. Okada y colaboradores (2016) estudiaron la adsorción y movilidad de glifosato bajo diferentes sistemas de labranza en tres tipos de suelos, un Haplustol éntico en la provincia de Córdoba, un Argiudol ácuico en la provincia de Entre Ríos y un Argiudol típico en la provincia de Buenos Aires. En este estudio se llevaron a cabo isotermas de adsorción y análisis de transporte vertical en columna. Se observó una fuerte adsorción a los suelos, con dependencia en el contenido de arcillas, de la capacidad de intercambio catiónico, concentración de fósforo y del pH. En el estudio de transporte vertical en columnas, se vio que el glifosato total que percoló fue de un 0,24%, no habiendo diferencias entre los diferentes sistemas de labranza como se mencionó anteriormente.

También se llevaron a cabo diversos estudios de monitoreo de glifosato y su metabolito AMPA en muestras de origen ambiental, motivados en su mayoría por el incremento del uso de este agroquímico y el cambio de las prácticas agrícolas aparejadas, y con el objetivo de generar información relevante para los distintos organismos de regulación ambiental. Las investigaciones, en su mayoría, se orientaron a estudiar tres tipos de matrices: suelo, aguas superficiales y sedimentos, haciendo foco en los distintos fenómenos de movilidad, ya sea por percolación o escorrentía.

Las primeras investigaciones publicadas en el país corresponden a Peruzzo y colaboradores (2008), en donde se determinó glifosato en suelo y en el curso de agua colindante a un campo sembrado con soja transgénica en la subregión de la pampa Ondulada. En el cuerpo de agua, se analizaron muestras superficiales y de sedimentos, tanto en las inmediaciones del campo, a 150 metros y a 1500 metros río abajo. Las tomas de muestra estuvieron asociadas a eventos relevantes como aplicaciones y precipitaciones de consideración. Las concentraciones de glifosato medidas en aguas superficiales

variaron entre 0,10 y 0,70 mg L<sup>-1</sup>, donde los mayores valores se obtuvieron luego de las precipitaciones, atribuyendo los investigadores este incremento a los fenómenos de escorrentía. Respecto a los sedimentos, las mayores concentraciones se obtuvieron luego de las aplicaciones de glifosato en el lote para los sitios de muestreo adyacente a éste y a 150 metros río abajo. Con las precipitaciones, la concentración decrece, producto, de acuerdo con los autores, con el aumento del caudal. En suelos, los valores obtenidos fueron desde 0,45 mg Kg<sup>-1</sup> (luego del evento de mayor precipitación) hasta 4,45 mg Kg<sup>-1</sup> (luego de una aplicación de 1,5 Kg ha<sup>-1</sup> en el lote). En el mismo estudio se midieron también muestras de aguas superficiales y sedimentos de otros arroyos y ríos de la región, los arroyos Areco, río Arrecifes, río Ramallo y arroyo del Medio, donde no se especifican los manejos ni producciones de las áreas cercanas. Los resultados de sedimentos obtenidos van desde menores al límite de detección (0,10 mg Kg<sup>-1</sup>) hasta 1,85 mg Kg<sup>-1</sup> en el río Ramallo. Las muestras de agua medidas presentaron concentraciones que van desde *No detectables* (LD: 0,04 mg L<sup>-1</sup>) a 0,56 mg L<sup>-1</sup> también el río Ramallo.

Un estudio realizado por Aparicio y colaboradores (2013), determinó las concentraciones de glifosato y AMPA en 44 cursos de agua y 16 lotes de producción agrícola de 9 partidos de la subregión de la pampa Austral. En este caso, los autores discriminaron tres tipos de muestras diferentes para cursos de agua: el agua superficial, sedimentos y el material particulado en suspensión, además de las muestras de suelo. Se encontraron concentraciones en suelo que van de los 35 a los 1.502 µg Kg<sup>-1</sup> para glifosato y 299 a 2.256 µg Kg<sup>-1</sup> para AMPA. Cabe señalar que las muestras fueron tomadas en períodos que van desde 1 día hasta 188 días luego de la aplicación del herbicida en el lote, y que, si bien las muestras de mayor concentración corresponden con las tomadas luego de 1 día de aplicación, se pierde luego la correlación entre la concentración y los días post aplicación. Destaca el hallazgo de glifosato y AMPA en suelos donde no se ha aplicado (utilizados como control). Esto, mencionan los autores, puede deberse a derivas en la aplicación y/o al movimiento de partículas del suelo de un campo a otro. En cuanto a las muestras de los arroyos de esta misma región, el glifosato fue detectado durante el mes de abril en un 35% y AMPA en un 33% de las muestras de aguas superficiales, con valores que van desde 0,5 a 4,0 µg L<sup>-1</sup> y 0,5 a 2,3 µg L<sup>-1</sup> respectivamente. En los meses subsiguientes se realizaron determinaciones en los mismos sitios y se observó un descenso en los resultados positivos para los dos analitos, que posiblemente esté relacionado con el régimen de precipitaciones y el tiempo transcurrido desde la última aplicación. En el material particulado en suspensión, el glifosato se detectó en un 53% de las muestras y el AMPA en un 16% con valores entre 2,2 a 562,8 µg Kg<sup>-1</sup> y 4,0 a 118,7 µg Kg<sup>-1</sup> respectivamente. Para otros períodos, los resultados positivos se incrementaron, contrariamente a lo que ocurrió con las muestras de agua, si bien los valores de concentraciones disminuyeron. En sedimentos, el glifosato se detectó en un 66% de las muestras y el

AMPA en un 89% con valores entre 5,7 a 221,2  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  y 5,1 a 235,0  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  respectivamente. El trabajo sugiere que el glifosato es transportado en el material particulado por efecto de escorrentía, en donde los lotes que utilizan glifosato en sus prácticas son los aportantes, si bien en este caso no hay vinculación directa entre los lotes y los cuerpos de agua.

Un ensayo a campo en donde se simularon precipitaciones 1, 5 y 8 días luego de la aplicación de una misma dosis de glifosato a parcelas con diferentes tratamientos (combinado o no, con una aplicación conjunta de fósforo), fue diseñado para determinar las cantidades de glifosato y AMPA en el agua de escorrentía, y el efecto que pudiera provocar una aplicación conjunta de fósforo en la movilidad del herbicida (Sasal et al., 2015). Allí, se observó un aumento en la movilidad del glifosato cuando este se aplicó de manera conjunta con fósforo. También se observó una menor cantidad de glifosato y AMPA en las aguas de escorrentía a medida que transcurrieron las diferentes simulaciones de lluvia. Glifosato y AMPA fueron positivos en los lotes control (sin ninguna aplicación) y el lote donde sólo se aplicó fósforo (un máximo de 74,1  $\mu\text{g L}^{-1}$  para glifosato y un máximo de 199,9  $\mu\text{g L}^{-1}$  para AMPA), debido a que la parcela utilizada fue aplicada con glifosato 2 meses antes del ensayo. Los autores estiman que un 28% de glifosato se pierde en la escorrentía producto de una lluvia de 60 mm, 1 día después de la aplicación, cuando ésta es acompañada de la fertilización con fósforo.

En la misma subregión de la Pampa mesopotámica, se realizó un monitoreo en 17 establecimientos, en donde se midieron glifosato y AMPA en suelos, aguas superficiales de arroyos colindantes a esos establecimientos (incluyendo material particulado en suspensión y sedimentos), y aguas subterráneas (Primost et al., 2017). Los resultados muestran que, en suelo, la ocurrencia de glifosato y AMPA es del 100%, con valores medios de 2.299  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  y 4.204  $\mu\text{g Kg}^{-1}$ . En aguas subterráneas los analitos no fueron detectados. En aguas superficiales, la detección de glifosato y fue de un 27% y la de AMPA de un 55%, con valores medios de 0,73  $\mu\text{g L}^{-1}$  y 0,65  $\mu\text{g L}^{-1}$  respectivamente. En el material suspendido asociado, la detección aumentó considerablemente, siendo del 100%, siendo las concentraciones promedio 340,2  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  para glifosato y 223,2  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  para AMPA. Por último, también fue ubicua la ocurrencia de los analitos en sedimentos, con medias de 1.126  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  para glifosato y 2.260  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  para AMPA.

Tal vez uno de los muestreos más complejos desde el punto de vista logístico fue llevado a cabo por Ronco y colaboradores (2016). Allí se determinaron concentraciones de glifosato y AMPA durante dos campañas (2011 y 2012) en aguas superficiales, sedimentos y material particulado a lo largo del curso del río Paraná, que posee una cuenca de 1.500.000  $\text{Km}^2$ , un caudal medio de 17.000  $\text{m}^3 \text{s}^{-1}$ , y moviliza por año una cantidad de materia en suspensión de 118,7 millones toneladas. Se tomaron muestras de 23 sitios, de los cuales 20 correspondieron a las confluencias del río Paraná con sus

principales tributarios y 3 a sectores del curso principal del río. A lo largo de las dos campañas, el 15% de las muestras resultó positiva para glifosato en agua superficial, con un valor medio de  $60,0 \mu\text{g L}^{-1}$ . No se detectó AMPA en ningún caso. En material particulado en suspensión, las muestras positivas para glifosato fueron del 39% y para el AMPA de un 9%, con un valor medio de  $0,1$  y  $0,04 \mu\text{g L}^{-1}$  respectivamente. El análisis de los sedimentos mostró un promedio de 37% de muestras positivas para glifosato y 17% para AMPA, con un valor medio de  $742$  y  $521 \mu\text{g Kg}^{-1}$  respectivamente. En la confluencia con el río Luján, se detectaron las máximas cantidades de analito,  $3.000 \mu\text{g Kg}^{-1}$  para glifosato y  $521 \mu\text{g Kg}^{-1}$  para AMPA. El estudio muestra que las detecciones de los analitos se dan en la parte media y baja del Paraná, donde recibe los aportantes pertenecientes a la región Pampeana, que es donde existe un alto grado de intensificación de las actividades agropecuarias.

En la subregión de la pampa Deprimida, Pérez y colaboradores (2017) realizaron estudios de monitoreo en el arroyo El Crespo durante la campaña 2014-2015. Los autores tomaron muestras de dos sitios en el curso del arroyo. Uno, localizado dentro del área de influencia de alta explotación agrícola, donde el 45% de cultivos corresponden a soja, 17% a girasol, 15% a trigo, 10% a maíz y el 13% restante a otros cultivos menores, abarcando un total de área sembrada de  $367 \text{ Km}^2$  en las cuales el glifosato es el principal agroquímico en uso (cubriendo el 98% de las hectáreas en explotación, de acuerdo con los autores). El otro,  $45 \text{ km}$  río abajo, se encuentra en una zona de pastizales, sin actividad agrícola. Las muestras se tomaron durante las 4 estaciones en 5 períodos de muestreo (primavera-verano-otoño-invierno-primavera). De un total de 30 pesticidas detectados, el glifosato y AMPA fueron hallados con más frecuencia. Se vio también una variación sitio y estación dependiente, donde las concentraciones más altas medidas fueron durante la primavera del 2014 en el sitio cercano a los lotes de actividad agrícola, donde los autores postulan que el alto índice de precipitación estaría relacionado con esta observación. La frecuencia de detección fue del 85% en aguas superficiales para ambos, y de un valor medio de  $0,78 \mu\text{g L}^{-1}$  y un máximo de  $2,9 \mu\text{g L}^{-1}$  para glifosato, y un valor promedio de  $0,32 \mu\text{g L}^{-1}$  y un máximo de  $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$  para AMPA. En sedimentos, los positivos fueron de 79% para glifosato y 96% para AMPA, con un promedio de  $3,85 \mu\text{g Kg}^{-1}$  y un máximo de  $18,50 \mu\text{g Kg}^{-1}$ , y un promedio de  $6,18 \mu\text{g Kg}^{-1}$  y un máximo de  $47,50 \mu\text{g Kg}^{-1}$  respectivamente.

En la tabla 1.4 y figura 1.7 se presenta un resumen de los trabajos anteriormente expuestos, además de otros que no han sido mencionados en párrafos anteriores. Si bien se han realizado monitoreos en toda la región Pampeana, las publicaciones disponibles sobre concentraciones de glifosato y AMPA en muestras de origen medioambiental son escasas para un país agrícola como el nuestro, en el que el uso de este herbicida es predominante. Los autores de estos trabajos coinciden en que el fenómeno de escorrentía es el principal causante de la movilización del glifosato del terreno

a los cuerpos de agua, siendo de gran importancia el tiempo que transcurre desde la aplicación hasta la primera lluvia, pero también la cantidad de glifosato aplicado y el nivel de precipitación. Los analitos fueron más frecuentemente detectados en sedimentos y en material en suspensión que en agua superficial, hecho que debe ser tenido en cuenta al momento de evaluar el impacto ambiental y, eventualmente, al momento de diseñar estrategias de mitigación de sus externalidades negativas.

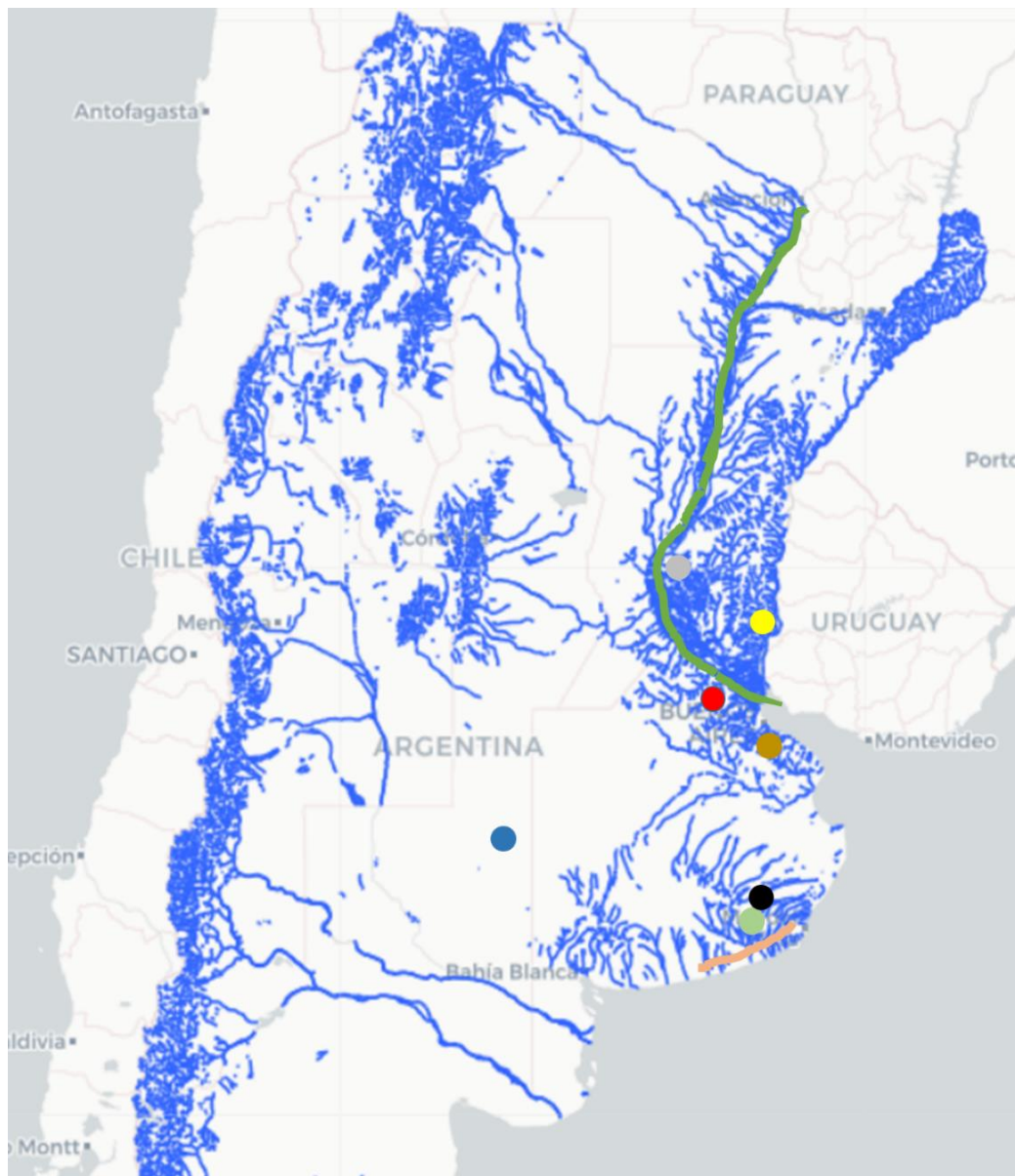
#### 1.2.4 Impacto del glifosato en los ecosistemas

Además de los estudios de persistencia y monitoreo en diferentes matrices ambientales, es necesario investigar el efecto que el glifosato puede tener en los diferentes organismos que integran los ecosistemas que alcanza de manera indirecta. Puede llegar al suelo tanto directamente desde la aplicación de la pulverizadora, como parte del goteo que escurre de las plantas (transgénicas o no) si llueve antes de que el herbicida pueda ser absorbido por éstas, dentro del tejido vegetal una vez que la maleza es controlada, o en el tejido vegetal del cultivo resistente. Una vez en el suelo, se moviliza a los distintos cuerpos de agua, aunque también puede llegar directamente a éstos como parte del agua del lavado de la maquinaria agrícola o el enjuague de bidones.

En cuerpos de agua, se observó que el glifosato ejerce efectos tóxicos sobre diversos organismos. Por ser un herbicida, las especies acuáticas que reportan mayor sensibilidad son las algas y plantas acuáticas. Por ejemplo, las microalgas tratadas con glifosato, ya sea como formulado o en grado técnico, mostraron sensibilidades que van desde valores de  $EC_{50}$  de  $0,68 \text{ mg L}^{-1}$  para la sustancia utilizada en grado técnico, mientras que el uso del formulado muestra un marcado incremento en la toxicidad en estos ensayos (Pérez et al., 2007), ya sea en microalgas o en macrófitos como *Lemna minor* (Cedergreen & Streibig, 2005). En estudios de micro y mesocosmos, se observaron efectos significativos utilizando dosis de entre  $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  y  $8 \text{ mg L}^{-1}$ , tanto en el número de especies como en la abundancia relativa de fitoplancton (Pérez et al., 2007; Pesce et al., 2009; Stachowski-Haberkorn et al., 2008; Vera et al., 2010).










Las cianobacterias en cambio, han mostrado cierto grado de resistencia en el ambiente acuático debido al efecto de eutroficación que produce el aporte de fósforo (Annett et al., 2014). También fueron reportados efectos tóxicos, en protozoos y bacterias, invertebrados, y vertebrados (Bonnet et al., 2007; Cauble & Wagner, 2005; Contardo-Jara et al., 2009; Everett & Dickerson, 2003; Pérez et al., 2007). En general, se observa también que los formulados son más tóxicos que el principio activo en sí en estos organismos. Los efectos tóxicos (ya sea letalidad o inhibición de algún parámetro del desarrollo) ejercidos por las distintas formulaciones, se correlacionan en muchos casos con los niveles

encontrados en acuíferos y aguas de escorrentía en nuestro país. En las publicaciones mencionadas, generalmente los organismos son estudiados de forma aislada, en micro o mesocosmos, en donde no existe la presencia de sedimentos, matriz de suma importancia en cuanto al destino del herbicida, como se comentó en el apartado 1.2.3.



**Figura 1.7.** Estudios de relevancia en el país sobre determinaciones ambientales de glifosato y AMPA en distintas regiones relacionadas con la producción agrícola. Cada color se corresponde con las referencias mencionadas en la tabla 1.4.

**Tabla 1.4.** Estudios de relevancia en el país sobre determinaciones ambientales de glifosato y AMPA en distintas regiones relacionadas con la producción agrícola.

Fecha de muestreo	Color en el mapa	Región	Sitio	Matriz	Concentración*		Referencias
					Glifosato	AMPA	
Desde el 11-2003 a 03-2004		Región Pampeana - Subregión Pampa ondulada	Curso de agua en el sistema Areco-Arrecifes, provincia de Buenos Aires. Muestreo en zona adyacente y río abajo de un lote de soja transgénica	Agua superficial	100-700 µg L <sup>-1</sup>		Peruzzo et al., 2008
				Sedimento	<10-4.900 µg kg <sup>-1</sup>		
				Suelo	530-4.450 µg kg <sup>-1</sup>		
				Agua superficial	<10-280 µg L <sup>-1</sup>		
				Sedimento	<10-1.380 µg kg <sup>-1</sup>		
Desde el 07-2011 al 07-2012		Región Mesopotámica - Delta del Paraná	23 sitios a lo largo del curso del Río Paraná	Agua superficial	0,6 µg L <sup>-1</sup>	ND	Rorico et al., 2016
				Sedimento	742 µg kg <sup>-1</sup>	521 µg kg <sup>-1</sup>	
				MSP	0,1 µg L <sup>-1</sup>	0,04 µg L <sup>-1</sup>	
				Agua superficial	0,73 µg L <sup>-1</sup>	0,65 µg L <sup>-1</sup>	
				Sedimento	1.126 µg kg <sup>-1</sup>	2.260 µg kg <sup>-1</sup>	
Desde 02-2012 a 03-2012		Región Pampeana - Subregión Pampa mesopotámica	17 establecimientos agropecuarios en la provincia de Entre Ríos	MSP	340,2 µg kg <sup>-1</sup>	223,2 µg kg <sup>-1</sup>	Primost et al., 2017
				Suelo	2.299 µg kg <sup>-1</sup>	4.204 µg kg <sup>-1</sup>	
				Agua subterránea	ND	ND	
				Agua superficial	0,5-40 µg L <sup>-1</sup>	0,5-23 µg L <sup>-1</sup>	
				Sedimento	5,7-221,2 µg kg <sup>-1</sup>	5,1-235,0 µg kg <sup>-1</sup>	
Desde el 04-2012 al 09-2012		Región Pampeana - Subregión Pampa austral	Partidos del sudeste de la provincia de Buenos Aires (Tres Arroyos, Adolfo Gonzales Chaves, San Cayetano, Necochea, Lobería, General Alvarado, General Pueyrredon, Balcarce y Mar Chiquita)	MSP	2,2-562,8 µg kg <sup>-1</sup>	4,0-118,7 µg kg <sup>-1</sup>	Aparicio et al., 2013
				Suelo	35-1502 µg kg <sup>-1</sup>	299-2256 µg kg <sup>-1</sup>	
				Agua escorrentía 1 DPA (GL)	767,2 µg L <sup>-1</sup>	561,5 µg L <sup>-1</sup>	
				Agua escorrentía 1 DPA (GL+P)	1407,6 µg L <sup>-1</sup>	463,7 µg L <sup>-1</sup>	
				Agua escorrentía 5 DPA (GL)	168,8 µg L <sup>-1</sup>	127,7 µg L <sup>-1</sup>	
Durante 11-2012		Región Pampeana - Subregión Pampa mesopotámica	Establecimiento agropecuario perteneciente a la Estación experimental Agropecuaria Paraná, provincia de Entre Ríos	Agua escorrentía 5 DPA (GL+P)	277,9 µg L <sup>-1</sup>	478,4 µg L <sup>-1</sup>	Sasal et al., 2015
				Agua escorrentía 8 DPA (GL)	65,5 µg L <sup>-1</sup>	262,2 µg L <sup>-1</sup>	
				Agua escorrentía 8 DPA (GL+P)	133,1 µg L <sup>-1</sup>	543,3 µg L <sup>-1</sup>	
				Agua superficial	<LC	0,5 µg L <sup>-1</sup>	
				Sedimento	3-14 µg kg <sup>-1</sup>	2-13 µg kg <sup>-1</sup>	
Desde 06-2012 a 01-2013		Región Pampeana - Subregión Pampa austral	4 sitios, uno adyacente al lote aplicado, uno río arriba y otro río abajo. El 4to sitio es el control de suelo. Río Quequén, provincia de Buenos Aires	Suelo	6,5-245,9 µg kg <sup>-1</sup>	5,6-291,2 µg kg <sup>-1</sup>	Lupi et al., 2017
				Agua superficial	0,78 µg L <sup>-1</sup>	0,32 µg L <sup>-1</sup>	
				Sedimento	3,85 µg kg <sup>-1</sup>	6,18 µg kg <sup>-1</sup>	
				Agua superficial	0,78 µg L <sup>-1</sup>	0,32 µg L <sup>-1</sup>	
				Sedimento	3,85 µg kg <sup>-1</sup>	6,18 µg kg <sup>-1</sup>	
Desde el 10-2014 al 10-2015		Región Pampeana-Subregión Pampa deprimida	Curso de agua El Crespo, provincia de Buenos Aires. Muestreo en zona adyacente y río abajo de zona de alta actividad agrícola	Agua superficial	0,78 µg L <sup>-1</sup>	0,32 µg L <sup>-1</sup>	Pérez et al., 2017
				Sedimento	3,85 µg kg <sup>-1</sup>	6,18 µg kg <sup>-1</sup>	
				Agua superficial	0,78 µg L <sup>-1</sup>	0,32 µg L <sup>-1</sup>	
				Sedimento	3,85 µg kg <sup>-1</sup>	6,18 µg kg <sup>-1</sup>	
				Agua superficial	0,78 µg L <sup>-1</sup>	0,32 µg L <sup>-1</sup>	
Durante 11-2015		Región Pampeana - Subregión Pampa interior	Establecimiento agropecuario perteneciente a la Facultad de Agronomía de la Universidad de la Pampa, provincia de La Pampa	Suelo	1-3 µg kg <sup>-1</sup>	80-150 µg kg <sup>-1</sup>	Mendez et al., 2017
				Fracción respirable del suelo	11,0-19,5 µg kg <sup>-1</sup>	530-750 µg kg <sup>-1</sup>	
				Sedimentos 1er campaña	18,0-98,9 µg kg <sup>-1</sup>	18,0-54,2 µg kg <sup>-1</sup>	
				Sedimentos 2da campaña	211,5-404,4 µg kg <sup>-1</sup>	86,2-224,9 µg kg <sup>-1</sup>	
				Sedimentos 2da campaña	211,5-404,4 µg kg <sup>-1</sup>	86,2-224,9 µg kg <sup>-1</sup>	
Desde 08-2015 a 01-2016		Región Pampeana - Subregión Pampa ondulada - Área metropolitana	5 sitios a lo largo del arroyo Carnaval, provincia de Buenos Aires	Suelo	1-3 µg kg <sup>-1</sup>	80-150 µg kg <sup>-1</sup>	Moc Loughlin et al., 2017
				Fracción respirable del suelo	11,0-19,5 µg kg <sup>-1</sup>	530-750 µg kg <sup>-1</sup>	
				Sedimentos 1er campaña	18,0-98,9 µg kg <sup>-1</sup>	18,0-54,2 µg kg <sup>-1</sup>	
				Sedimentos 2da campaña	211,5-404,4 µg kg <sup>-1</sup>	86,2-224,9 µg kg <sup>-1</sup>	
				Sedimentos 2da campaña	211,5-404,4 µg kg <sup>-1</sup>	86,2-224,9 µg kg <sup>-1</sup>	



En suelo, el glifosato mostró toxicidad también en diferentes niveles tróficos. Existen reportes en donde se observa que el uso de glifosato estimula tanto especies de hongos (algunos patógenos) como el *Fusarium solani*, *Pithyium ultimum*, *Corynespora cassicola* y *Sclerotinia sclerotiorum* (Johal & Huber, 2009; Kawate et al., 1997) así como también se observó estímulo a nivel de comunidades (Anza et al., 2016). En micorrizas arbusculares, se observa que la exposición a glifosato produce un efecto negativo (Druille et al., 2013). Se reportaron también alteraciones en nematodos como *Caenorhabditis elegans*, *Eisenia fetida*, *Lumbricus terrestris* y *Lumbriculus variegatus* (Contardo-Jara et al., 2009b; Gaupp-Berghausen et al., 2015; McVey et al., 2016; Verrell & Van Buskirk, 2004; Wang et al., 2017) y artrópodos como *Alpaida veniliae*, *Pardosa milvina*, *Chrysoperla externa*, *Eriopis connexa* y *Apis mellifera* (Schneider et al., 2009; Benamú et al., 2010; Mirande et al., 2010; Griesinger et al., 2011; Helmer et al., 2015).

### 1.2.5 Impacto del glifosato en la salud humana

Existe una amplia variedad de trabajos de investigación que incluye ensayos de toxicidad en mamíferos, estudios epidemiológicos y monitoreos en humanos, cuyo objetivo es estudiar los distintos efectos deletéreos que puede provocar el glifosato sobre la salud humana.

Los valores de dosis letal 50 (LD<sub>50</sub>) en rata (4.373 mg Kg<sup>-1</sup>) y conejo (3.800 mg Kg<sup>-1</sup>) por vía oral (Denton, 2007), indican un bajo nivel de toxicidad aguda. En un estudio realizado en Sri Lanka entre el año 2002 y 2007 (Roberts et al., 2010), se analizaron 601 pacientes que ingirieron distintos tipos de formulados (en su mayoría en su presentación de 36% p/v). Entre ellos, 166 cursaron la intoxicación de manera asintomática (ingesta promedio reportada 50 mL), 383 con sintomatología menor, cuyos signos náusea, vómitos, dolor abdominal y sedación (ingesta promedio reportada de 58 mL), 33 con sintomatología moderada a severa, con signos de hipotensión, oliguria, paro respiratorio y/o cardíaco, disritmias ventriculares, sedación o coma y convulsiones (ingesta promedio reportada 53 mL) y en 19 individuos la intoxicación resultó fatal (ingesta promedio reportada 200 mL). Se encontraron asociaciones entre la mortalidad y la edad, la magnitud de la ingesta y las concentraciones de glifosato en plasma al momento del ingreso (concentraciones mayores a 734 µg mL<sup>-1</sup>).

En una revisión publicada por Myers y colaboradores (2016), expertos en ciencias del medio ambiente y salud, se mencionan las principales asociaciones entre la exposición crónica de glifosato y diferentes patologías. Entre los efectos adversos crónicos destacados, puede mencionarse el daño

oxidativo en hígado de rata y riñones que el glifosato provoca al alterar el metabolismo mitocondrial en los niveles de exposición actualmente considerados seguros y aceptable por las agencias reguladoras. Se ha observado un aumento de incidencia de enfermedad renal crónica grave en trabajadores rurales de regiones donde existe un alto grado de uso de glifosato. El glifosato y sus formulados funcionan como disruptores endócrinos *in-vitro*, incluidas varias hormonas esteroideas relevante en vertebrados (Benachour et al., 2007; Romano et al., 2010). En ratas, una dosis subletal de un formulado implicó deterioro del desarrollo reproductivo. La ingesta crónica puede alterar el microbioma gastrointestinal en vertebrados. Soja con valores de glifosato residuales altos utilizada como alimento de aves de corral y criaderos, está asociada a problemas gastrointestinales y congénitos en cerdos y en aves de corral. Por último, el uso de formulados está relacionado con un incremento en la incidencia de linfoma no Hodgkin.

La evidencia entre la ocurrencia de linfoma no Hodgkin y el uso de formulados de glifosato llevó a una reevaluación respecto a su peligrosidad, adquiriendo la categoría “2A”, que indica que es probable agente cancerígeno (International Agency for Research on Cancer, 2014; Guyton et al., 2015).

### 1.3 Estrategias para la remediación de suelos contaminados con agroquímicos

Los contaminantes llegan al ambiente producto de distintas actividades antropogénicas, ya sea como consecuencia de accidentes (derrames durante el transporte, almacenamiento incorrecto en depósitos, pérdidas en el lugar donde es contenido, etc.) o como consecuencia implícita de la actividad (durante su producción, desecho de efluentes, aplicaciones en sitios no blanco, etc.). En cualquiera de estos casos, surge la necesidad de recuperar el suelo contaminado y así evitar los riesgos que la presencia del contaminante pudiese generar en relación a la salud humana y el medio ambiente. En respuesta a estos eventos de contaminación se desarrollaron diversas estrategias de remediación, que tienen en cuenta tanto la naturaleza y el origen del contaminante, como la extensión de la contaminación, la celeridad con la que debe ser removido el contaminante, las regulaciones medioambientales, costos, y la posibilidad de efectuar el proceso *in-situ* o *ex-situ*. En base a qué procesos estén implicados en la estrategia de remoción del xenobiótico, pueden distinguirse métodos físicos, métodos químicos y métodos biológicos, siendo también posible su combinación (Lim et al., 2016).

Entre los métodos físicos y químicos, se puede encontrar la desorción térmica, la incineración, el tratamiento térmico con microondas, la extracción con solventes y surfactantes, extracción con vapor, tratamiento con ultrasonido, oxidaciones químicas y electrocinéticas, etc. Estos tratamientos se llevan a cabo tanto *in-situ* como *ex-situ* y han demostrado ser exitosos frente a diversos xenobióticos, si bien poseen serias desventajas, como la destrucción de la estructura del suelo y de las comunidades microbianas y muchas veces la incapacidad de remover completamente el contaminante, quedando este fuertemente adsorbido (Gan et al., 2009; Concetta Tomei & Daugulis, 2013).

Los métodos biológicos desarrollados para la remoción de xenobióticos del suelo *in-situ* son aquellos basados en el uso de microorganismos (bacterias y/u hongos), o en el uso de plantas vasculares (pudiendo involucrar a los microorganismos asociados a éstas).

Ya sea por la extensión en la que ocurre la contaminación, los costos relacionados con su aplicación, el uso continuo de los contaminantes a remediar o el cuidado del propio recurso (suelo), generar una solución en respuesta a la contaminación de suelos por pesticidas en la República Argentina supone abandonar los métodos físicos y químicos. Es por ello que nos enfocaremos en los métodos de remediación biológicos.

### 1.3.1 Biorremediación

La biorremediación es el proceso por el cual se reduce la toxicidad, movilidad o cantidad del contaminante de una matriz (ej: suelo, agua) por medio de sistemas biológicos, principalmente microorganismos o derivados de ellos (Ritter & Scarborough, 1995; Chen et al., 2015; Singh et al., 2016). En este caso, los microorganismos transformarán el contaminante empleando las capacidades metabólicas que tengan disponibles, siendo ello posible tanto en aerobiosis como en anaerobiosis.

La eficiencia en este tipo de procesos dependerá de las propiedades de los microorganismos que habitan la matriz, de los factores ambientales y de las características del contaminante que se está intentando remediar. El proceso será más eficiente (en términos temporales y cuantitativos) si los microorganismos presentes poseen un complemento génico adecuado, son metabólicamente dinámicos y flexibles, tienen la capacidad de tomar y secuestrar el xenobiótico, son adecuadamente tolerantes y poseen propiedades que facilitan la biodegradación, como la producción de surfactantes (que hace al contaminante más biodisponible) o la quimiotaxis (que permite el acercamiento del microorganismo). La biodisponibilidad del contaminante en la matriz va a depender de la capacidad de adsorción/absorción que tenga a la fase sólida. A su vez, los factores ambientales como el pH, humedad, tensión de oxígeno, condiciones hidráulicas y potencial de óxido-reducción, van a mediar tanto la capacidad metabólica de los microorganismos como también influenciar el grado de interacciones fisicoquímicas entre el contaminante y el suelo (Gkorezis et al., 2016).

#### Estrategias de biorremediación

Los procedimientos documentados de biorremediación *in-situ* consisten en tres tipos de aproximaciones: la atenuación natural, el bioaumento y la bioestimulación.

Los procesos de atenuación natural refieren a todos los procesos físicos, químicos o biológicos que, bajo condiciones favorables, actúan sin intervención humana para reducir la concentración del contaminante a productos menos tóxicos o inocuos, ya sea en suelos como en aguas subterráneas (Khan et al., 2004). La aproximación consiste en el monitoreo de la extensión de la superficie contaminada, y es válido siempre y cuando: i) el proceso de degradación del contaminante sea llevado a cabo mayoritariamente por las comunidades microbianas del sitio contaminado; ii) el sitio no requiera ser descontaminado con urgencia; iii) la atenuación natural sea eficiente en un período aceptable de tiempo y iv) la extensión de la contaminación haya sido determinada pertinentemente. Se han aplicado dichos monitoreos para hidrocarburos alifáticos de cadena larga e hidrocarburos

aromáticos (ICCS, 2006), aunque la atenuación natural no es de elección frente a contaminantes orgánicos persistentes (Megharaj & Naidu, 2017).

Un proceso de bioaumento implica la introducción de microorganismos degradadores específicos para la remediación del sitio contaminado, siendo esto necesario cuando los microorganismos nativos, presentes en la matriz ambiental, no pueden degradar el contaminante o no lo hacen a la velocidad deseada. En este caso, los microorganismos introducidos (que han sido previamente aislados y cultivados) deben poseer, como principal característica, la maquinaria enzimática necesaria para degradar el o los contaminantes presentes. A su vez, la cepa o consorcio seleccionado deberá idealmente tener una alta tasa de degradación del contaminante (Min et al., 2017), ser de rápido crecimiento y fácil de cultivar, tolerante a las concentraciones de contaminante presentes en el área a descontaminar y poseer la capacidad de adaptarse y subsistir una vez agregado en el sitio.

El aislamiento de la cepa puede provenir del mismo sitio contaminado o de otro sitio, aunque la supervivencia y proliferación de microorganismos exógenos al sitio contaminado generalmente es dificultosa. Es por eso que la mayoría de las estrategias de bioaumento se realizan con microorganismos autóctonos, combinándose la capacidad de degradación con la adaptación al entorno. El bioaumento fue probado en la depuración de compuestos clorados volátiles, diesel y metales pesados, DDT, lindano, endosulfan, pentaclorofenol (PCP), hidrocarburos poliaromáticos e hidrocarburos totales del petróleo (Alisi et al., 2009; Abhilash et al., 2011; Saez et al., 2014; Wang et al., 2014; Chen et al., 2015; Kuppusamy et al., 2016).

La bioestimulación engloba a todos los procesos cuyo objetivo sea el de generar un ambiente propicio, que estimule la actividad metabólica hacia el contaminante por parte de las comunidades microbianas presentes en el sitio contaminado, generalmente mediante el agregado de aditivos. En este caso, la población microbiana nativa posee una capacidad degradadora intrínseca, pero esa degradación natural no se produce o bien ocurre a una velocidad demasiado baja. La bioestimulación incluye el agregado de nutrientes esenciales como el nitrógeno, fósforo y potasio, así como también abonos de origen animal, heno de arroz, aguas residuales de origen doméstico, carbón y residuos de cultivos. También se incluyen otros aditivos como biosufractantes, y aceptores de electrones ( $O_2$  y  $Fe(III)$ ) (Gkorezis et al., 2016; Ruberto et al., 2009). Ejemplos de estos procesos son la reducción de percloratos (Waller et al., 2004), y diversos hidrocarburos derivados del petróleo, como diesel, pireno y fenantreno (Gkorezis et al., 2016).

Las principales ventajas de la biorremediación surgen cuando se compara este tipo de procesos con los métodos físicos y químicos convencionales, ya que estos últimos suelen ser más costosos; en

parte porque generalmente son de aplicación *in-situ* y en parte porque requieren una menor complejidad logística y de insumos. A su vez, esta tecnología es amigable con el ambiente, manteniendo las propiedades del suelo según el manejo propuesto. Además, es aplicable a gran variedad de contaminantes, entre ellos pesticidas, aunque muchos de esos trabajos no se han realizado a escala de campo (Chen et al., 2015; Lalevic et al., 2016; Lim et al., 2016; Singh et al., 2016; Sun et al., 2018).

Entre sus limitaciones, podemos mencionar que, por ser procesos biológicos, el contaminante puede no ser degradado completamente, pudiendo los metabolitos o productos de degradación ser, en algunos casos, más tóxicos que el compuesto original. Son generalmente más lentos que los procesos de remediación físicos y químicos, pudiendo muchas veces no ser una alternativa si el sitio contaminado requiere ser intervenido de manera urgente. Son sitio específico por lo que cada proceso deberá ser, en mayor o menor medida, optimizado en función de la matriz, condiciones climáticas, y otros diversos factores que correspondan al sitio a remediar.

### **1.3.2 Fitorremediación**

La fitorremediación refiere al uso de especies vegetales y su microflora asociada para la remoción, degradación o estabilización de contaminantes en aguas, suelos y sedimentos. Conforman un conjunto de tecnologías que hacen uso de procesos naturales por los cuales las plantas y microorganismos asociados son capaces de degradar, transformar, secuestrar, inmovilizar o volatilizar al contaminante, que puede ser de naturaleza orgánica o inorgánica.

La fitorremediación es una tecnología en auge, siendo incorporada por sectores públicos y privados por tratarse de una alternativa innovadora, amigable con el medio ambiente y económicamente superadora respecto a otras tecnologías de remediación de suelos (Vangronsveld et al., 2009; Gerhardt et al., 2017; Thijs et al., 2017).

Entre las principales ventajas de estas tecnologías, pueden ser mencionadas las siguientes:

- Es aplicable a una gran extensión de superficie contaminada.
- Puede ser utilizada paralelamente con otras tecnologías.
- De gran aceptación pública, por ser amigable con el ambiente y aportar valor estético.
- Presenta simplicidad y facilidad de aplicación.

- Su implementación *in-situ*, que contribuye a disminuir los costos y los riesgos de exposición al contaminante.
- Por tratarse de una implantación, generalmente mejora las propiedades del suelo como estructura, fertilidad, materia orgánica a la vez que disminuye la erosión hídrica y eólica.
- No requiere de grandes gastos operativos.

Entre las desventajas, podemos mencionar

- El tratamiento es de mayor duración, si lo comparamos con métodos físicos o químicos.
- El sistema radicular de la especie vegetal va a ser la limitante en cuanto a la profundidad que alcance el proceso de fitorremediación.
- Las propiedades del suelo y el clima deben ser consideradas también al momento de la selección de la especie vegetal adecuada.
- El proceso está limitado a la fracción del contaminante biodisponible.
- Posibilidad de contaminación de cadena alimentaria.
- Se usa para niveles de contaminación moderados y de localización superficial (algunos metros de profundidad).

#### Estrategias de fitorremediación

Llevar a buen término un proceso de fitorremediación requiere contemplar una gran cantidad de variables. Se deben conocer las características fisicoquímicas del contaminante, así como también su comportamiento en la matriz ambiental donde va a ser remediado, el clima de la región, la dinámica del sistema productivo, los niveles finales de xenobiótico a los que se aspira llegar al implementar la metodología. En este contexto, la elección de una especie vegetal y la posterior caracterización en función del método de fitorremediación propuesto son, por supuesto, de gran importancia.

De forma general, se pueden identificar cinco tipos de procesos de fitorremediación, clasificación que se hace en base al destino que sufre el xenobiótico y en qué compartimento del vegetal ocurre: fitotransformación, fitovolatilización, fitoestabilización, fitoextracción y rizorremediación.

##### 1.3.2.1 Fitotransformación

En la fitotransformación, el contaminante, de naturaleza orgánica, es captado por las plantas y metabolizado gracias al propio sistema enzimático vegetal. La maquinaria enzimática vegetal, o “hígado verde” como Sandermann lo llamó (1992), logra entonces degradar total o parcialmente al xenobiótico. Si la degradación es parcial, los metabolitos resultantes quedarán asociados al tejido vegetal, ya sea secuestrado en las vacuolas o en la pared celular.

Una vez que ocurre la implantación de la especie vegetal, el contaminante deberá ser captado por ésta, para luego ser metabolizado. Las sustancias muy hidrofóbicas se unirán a la fracción húmica del suelo, por lo que el transporte del xenobiótico dentro de la planta dependerá de la biodisponibilidad del mismo (que, a la vez, está relacionada con la estructura química y la matriz ambiental), así como de la estructura radicular. La naturaleza xenobiótica de muchos compuestos orgánicos implica que, por norma general, no existen transportadores de dichos contaminantes al interior celular, por lo que la captación se realiza principalmente por difusión a través de las bicapas lipídicas y paredes celulares. El grado de hidrofobicidad del contaminante, medido en base al coeficiente octanol-agua ( $K_{ow}$ ) determinará en gran medida el ingreso y posterior transporte vía xilema. De acuerdo con Reichenhauer & Germida (2008), sustancias con un  $\log K_{ow}$  entre 0,5 y 3,0 son las que mejor absorción tienen. Aquellas que son muy hidrofílicas, con  $\log K_{ow}$  menores a 0,5 pueden transportarse dentro de la planta, pero no cruzar la bicapa lipídica plasmática. Las sustancias muy hidrofóbicas, de  $\log K_{ow}$  mayores a 3,0 quedan retenidas en la membrana plasmática y se hacen poco disponibles a la maquinaria enzimática celular.

Una vez internalizado, la metabolización del contaminante transcurre en tres fases: La fase I o de transformación, en donde transcurre se producen diferentes oxidaciones, reducciones e hidrólisis de la molécula, que la lleva a hacerse más polar y por lo tanto más soluble. Participan de este proceso enzimas como la superfamilia de hemoproteínas citocromo P<sub>450</sub>, deshalogenasas, peroxidasas, o las carboxilesterasas. Luego le siguen las reacciones de fase II o de conjugación, en donde los metabolitos son conjugados en su mayoría con moléculas de glutatión, UDP-glucosa y otros dinucleótidos activados, aminoácidos y azúcares. En la fase III o de compartimentalización, la molécula es almacenada en vacuola o apoplastos de la célula vegetal, o incorporada a la pared celular mediante el proceso de lignificación.

Varios procesos de fitotransformación se han llevado a cabo en remediación de herbicidas, usándose ya sea cultivos de valor productivo o plantas del propio ecosistema de gran adaptabilidad. Entre las plantas más utilizadas, se encuentran *Cucurbita pepo*, *Zea mays*, *Lolium multiflorum*, *Plantago major*, *Typha latifolia* y *Lemna minor*.



#### 1.3.2.2 Fitoestabilización

La fitoestabilización es una estrategia de manejo que implica la estabilización del xenobiótico en el suelo, reduciendo su biodisponibilidad, mediante el uso de especies vegetales y, según el caso, agregados -enmiendas- de distinta naturaleza química (Vangronsveld et al., 2009). Los contaminantes tratados a través de estos procesos son de naturaleza inorgánica (en general metales pesados), sin embargo, las enmiendas que permiten estabilizar los distintos elementos son de distinta naturaleza química (ej: hidroxiapatita, fosfatos, elementos traza (Fe y Mn), zeolitas, cenizas y materiales orgánicos como biosólidos, lodos o compost) (Adriano et al., 2004). A su vez, el hecho de establecer una cobertura vegetal permite evitar la dispersión del contaminante por percolado o escorrentía, o por la propia acción del viento. Luego de estabilizado, el terreno puede ser tratado con otro proceso para retirar el metal contaminante.

#### 1.3.2.3 Fitoextracción

La fitoextracción, utiliza la capacidad que poseen ciertas especies vegetales para acumular uno o varios metales en su tejido, extrayéndolos del suelo por la raíz (Maric et al., 2013). Las plantas, generalmente de baja tasa de crecimiento, deben ser cosechadas una vez culminado el crecimiento, ya que el contaminante (metales pesados o radionucleídos) no puede ser transformado. En la selección de la especie vegetal se deben tener en cuenta, principalmente, los siguientes aspectos: i) que ésta sea tolerante al elemento en las concentraciones presentes en el sitio contaminado que se desee remediar, ii) que tenga la mayor tasa de crecimiento posible, manteniendo un alto grado de eficiencia en la acumulación del contaminante, iii) que el elemento sea acumulable en las partes aéreas y iv) que sea fácil de cosechar (Ghori et al., 2015; Truu et al., 2015).

#### 1.3.2.4 Fitovolatilización

La fitovolatilización se basa en la absorción del contaminante por la especie vegetal, el que luego es volatilizado, a través del proceso de evapotranspiración natural, liberándose en la atmósfera. Puede ser liberado de la misma forma que fue absorbido o parcialmente metabolizado. Esta es una estrategia utilizada cuando se desea remediar contaminantes orgánicos volátiles, capaces de ser degradados rápidamente por la acción de la radiación UV y el oxígeno atmosférico. También existe una forma

indirecta de fitovolatilización, que está relacionada con el aumento del transporte del contaminante hacia las capas más superficiales del suelo, producto del bombeo de agua por parte de las raíces (Limmer & Burken, 2016).

#### 1.3.2.5 Rizorremediación

La rizorremediación es el proceso de degradación del contaminante por medio de los microorganismos que habitan la rizosfera. La rizosfera es el volumen de suelo que se encuentra bajo la influencia del sistema radicular de la planta, en donde existe un incremento en la cantidad de microorganismos de varios órdenes de magnitud respecto al suelo desprovisto de raíces. Este fenómeno, conocido como “efecto rizosférico” (Hartmann et al., 2008; Hussain et al., 2009) es generado por el estímulo físico y químico que la planta produce en la zona de influencia de la raíz. Los factores más importantes involucrados en la estimulación son:

- El aumento de la tensión de oxígeno en el suelo cercano a las raíces, como así también la porosidad y permeabilidad, asegurando la ocurrencia de reacciones aeróbicas.
- La liberación de exudados radiculares, que son un conjunto de compuestos orgánicos entre los que se encuentran los carbohidratos como glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa y oligosacáridos; aminoácidos como glicina, ácido glutámico, serina, lisina y arginina; compuestos aromáticos como fenoles e isoprenoides; ácidos orgánicos como el ácido acético, propiónico, cítrico, butírico y málico; compuestos volátiles como el etanol, metanol, formaldehído, acetona, acetaldehído y propionaldehído; vitaminas como la tiamina, biotina, niacina, riboflavina, piridoxina y ácido pantoténico; y enzimas como las fosfatasas, deshidrogenasas, peroxidasas, deshalogenasas, nitroreductasas, lacasas y nitrilasas. Los exudados, en combinación con el mucigel de las raíces y la descamación celular, generan un ambiente con abundante disponibilidad de nutrientes para las comunidades microbianas heterótrofas que habitan la rizosfera, y en consecuencia se produce un incremento en número y actividad metabólica (Gerhardt et al., 2009; Glick, 2010; Schnoor, 2002; Segura & Ramos, 2013).
- La presencia, dentro de las moléculas secretadas, de metabolitos secundarios capaces de inducir sistemas enzimáticos relacionados con la metabolización del contaminante en los microorganismos, o directamente estimular vías metabólicas actuando como cometabolitos (Segura et al., 2009).

A su vez, las comunidades microbianas también pueden ejercer un efecto benéfico sobre la planta, produciendo una serie de compuestos como enzimas, hormonas, ácidos orgánicos, y solubilizadores de diferentes nutrientes, y cuyo resultado será el incremento del área radicular y mejorar la disponibilidad de nutrientes y protección contra otros microorganismos patógenos.

El proceso de rizorremediación es una combinación entre la biorremediación y la fitorremediación, en donde la especie vegetal sirve de plataforma a los microorganismos, para que éstos degraden el xenobiótico. La degradación puede ocurrir naturalmente o, puede desarrollarse un proceso mediante el cual se aíslan bacterias u hongos rizosféricos degradadores del xenobiótico, con el objetivo de re-inocularlas en la planta previo a la siembra. En bibliografía también se pueden encontrar varios estudios de rizorremediación de plaguicidas (Eevers et al., 2017).

En este contexto, y teniendo en cuenta las grandes extensiones de suelo dedicadas a las prácticas agrícolas intensivas basadas en el uso de agroquímicos, la aplicación de estrategias de rizorremediación surge como la alternativa biotecnológica de elección para mitigar el impacto ambiental asociado a este modelo productivo.

#### **1.4 Una estrategia de rizorremediación de glifosato para la Pampa Húmeda Argentina**

El modelo agrícola-productivo predominante en la región de la Pampa Húmeda se basa, actualmente, en la explotación de cultivos que requieren del glifosato para su manejo. La geografía imperante de llanura permite distinguir en éstas, pequeñas lomas de poca pendiente y sus correspondientes zonas bajas, por donde escurren las aguas de precipitación y transitan los cuerpos de agua superficiales, como canales, arroyos y ríos. Este relieve, si bien muchas veces es imperceptible, es ciertamente significativo, ya que la fertilidad de los bajos es menor por presentar fenómenos de hidromorfismo, sodicidad y salinidad, que afectan directamente a la implantación y rendimiento del cultivo. Es por eso que el productor agropecuario, circunscribe muchas veces el cultivo a las lomas, destinando el uso de los bajos para ganadería.

La necesidad de no interferir con la explotación agrícola principal hace que la estrategia de mitigación de glifosato limite la implantación de sistema de rizorremediación a, por lo menos, dos lugares dentro del lote de producción agrícola.

Uno, entre la loma y el bajo, se propone implantar los sistemas planta-microorganismos como barrera frente a la escorrentía proveniente de la loma, impidiendo que el pesticida en ésta acarreea llegue a los cuerpos de agua superficiales.

Otro, en la loma, propone la implantación del sistema remediador en la modalidad de intersembrado con el cultivo principal. De esta forma, aplicándolo luego del barbecho químico, se estabilizaría el glifosato residual en suelo en la zona de influencia de la raíz, favoreciendo la degradación y evitando movimientos verticales y horizontales de la molécula.

Estos dos enfoques serán los considerados como estrategias al pensar el uso del sistema de rizorremediación a ser desarrollado en el presente trabajo de tesis.

## 1.5 Referencias

- Abhilash, P. C., Srivastava, S., and Singh, N. (2011). Comparative bioremediation potential of four rhizospheric microbial species against lindane. *Chemosphere* 82, 56–63. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.10.009.
- Adriano, D. C., Wenzel, W. W., Vangronsveld, J., and Bolan, N. S. (2004). Role of assisted natural remediation in environmental cleanup. *Geoderma* 122, 121–142. doi:10.1016/j.geoderma.2004.01.003.
- Agroindustria, M. de (2017). El futuro de la agricultura. *INTA*. Available at: <http://intainforma.inta.gov.ar/wp-content/uploads/2012/07/Especial-INTA-Infoma-Junio-2017.pdf>.
- Albanesi, R. (2005). Inversión en maquinarias y concentración en el uso de la tierra en el sur santafesino. *Agromensajes*. Available at: <http://hdl.handle.net/2133/585>.
- Alisi, C., Musella, R., Tasso, F., Ubaldi, C., Manzo, S., Cremisini, C., et al. (2009). Bioremediation of diesel oil in a co-contaminated soil by bioaugmentation with a microbial formula tailored with native strains selected for heavy metals resistance. *Sci. Total Environ.* 407, 3024–3032. doi:10.1016/j.scitotenv.2009.01.011.
- Altieri, M. A., and Pengue, W. (2006). GM soybean : Latin America ' s new coloniser. *Seedling*, 13–17.
- Annett, R., Habibi, H. R., and Hontela, A. (2014). Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. *J. Appl. Toxicol.* 34, 458–479. doi:10.1002/jat.2997.
- Anza, M., Epelde, L., Artetxe, U., Becerril, J. M., and Garbisu, C. (2016). Control of *Cortaderia selloana* with a glyphosate-based herbicide led to a short-term stimulation of soil fungal communities. *Environ. Monit. Assess.* 188, 631. doi:10.1007/s10661-016-5649-9.
- Aparicio, V. C., De Gerónimo, E., Marino, D., Primost, J., Carriquiriborde, P., and Costa, J. L. (2013). Environmental fate of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins. *Chemosphere* 93, 1866–1873. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.06.041.
- Barry, G., Kishore, G., Padgett, S., Taylor, M., Kolacz, K., Weldon, M., et al. (1992). Inhibitors of amino acid biosynthesis: strategies for imparting glyphosate tolerance to crop plants. *Curr. Top. plant Physiol.* 7, 139–145.

- Benachour, N., Sipahutar, H., Moslemi, S., Gasnier, C., Travert, C., and Séralini, G. E. (2007). Time- and dose-dependent effects of roundup on human embryonic and placental cells. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 53, 126–133. doi:10.1007/s00244-006-0154-8.
- Benamú, M. A., Schneider, M. I., and Sánchez, N. E. (2010). Effects of the herbicide glyphosate on biological attributes of *Alpaida veniliae* (Araneae, Araneidae), in laboratory. *Chemosphere* 78, 871–876. doi:https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.11.027.
- Benbrook, C. M. (2016). Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environ. Sci. Eur.* 28, 3. doi:10.1186/s12302-016-0070-0.
- Bento, C. P. M., Yang, X., Gort, G., Xue, S., van Dam, R., Zomer, P., et al. (2016). Persistence of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in loess soil under different combinations of temperature, soil moisture and light/darkness. *Sci. Total Environ.* 572, 301–311. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.07.215.
- Bonnet, J.-L., Bonnemoy, F., Dusser, M., and Bohatier, J. (2007). Assessment of the potential toxicity of herbicides and their degradation products to nontarget cells using two microorganisms, the bacteria *Vibrio fischeri* and the ciliate *Tetrahymena pyriformis*. *Environ. Toxicol.* 22, 78–91. doi:10.1002/tox.20237.
- Carpenter, J. E., and Gianessi, L. P. (2010). “Economic Impact of Glyphosate-Resistant Weeds,” in *Glyphosate Resistance in crops and weeds*, ed. V. K. Nandula (Hoboken, New Jersey: Wiley & Sons, Inc.), 297–312.
- Castle, L. A., Siehl, D. L., Gorton, R., Patten, P. A., Chen, Y. H., Bertain, S., et al. (2004). Discovery and Directed Evolution of a Glyphosate Tolerance Gene. 304, 1151–1154.
- Cauble, K., and Wagner, R. S. (2005). Sublethal effects of the herbicide glyphosate on amphibian metamorphosis and development. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 75, 429–435. doi:10.1007/s00128-005-0771-3.
- Cedergreen, N., and Streibig, J. C. (2005). The toxicity of herbicides to non-target aquatic plants and algae : assessment of predictive factors and hazard. 1160, 1152–1160. doi:10.1002/ps.1117.
- Chee, F. Y. (2018). Bayer wins EU approval for \$62.5 billion Monsanto buy. Available at: <https://www.reuters.com/article/us-monsanto-m-a-bayer-eu/bayer-wins-eu-approval-for-62-5-billion-monsanto-buy-idUSKBN1GX14U> [Accessed March 21, 2018].
- Chen, M., Xu, P., Zeng, G., Yang, C., Huang, D., and Zhang, J. (2015). Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and

- heavy metals by composting: Applications, microbes and future research needs. *Biotechnol. Adv.* 33, 745–755. doi:10.1016/j.biotechadv.2015.05.003.
- Concetta Tomei, M., and Daugulis, A. J. (2013). Ex situ bioremediation of contaminated soils: An overview of conventional and innovative technologies. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 43, 2107–2139. doi:10.1080/10643389.2012.672056.
- Contardo-Jara, V., Klingelmann, E., and Wiegand, C. (2009a). Bioaccumulation of glyphosate and its formulation Roundup Ultra in *Lumbriculus variegatus* and its effects on biotransformation and antioxidant enzymes. *Environ. Pollut.* 157, 57–63. doi:10.1016/j.envpol.2008.07.027.
- Contardo-Jara, V., Klingelmann, E., and Wiegand, C. (2009b). Bioaccumulation of glyphosate and its formulation Roundup Ultra in *Lumbriculus variegatus* and its effects on biotransformation and antioxidant enzymes. *Environ. Pollut.* 157, 57–63. doi:https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.07.027.
- Day, G. M., Hart, B. T., McKelvie, I. D., and Beckett, R. (1997). Influence of Natural Organic Matter on the Sorption of Biocides onto Goethite, II. Glyphosate. *Environ. Technol.* 18, 781–794. doi:10.1080/09593331808616597.
- Daza, C. G., Econom, G., Eea, I., and Ju, M. (2016). La agricultura pampeana, evolución de resultados económicos en el período 1990- 2016 (\*) (\*). 2016.
- de la Fuente, E. B., Suárez, S. A., and Ghersa, C. M. (2006). Soybean weed community composition and richness between 1995 and 2003 in the Rolling Pampas (Argentina). *Agric. Ecosyst. Environ.* 115, 229–236. doi:10.1016/j.agee.2006.01.009.
- de Obschatko, E. S. (1988). *La transformación económica y tecnológica de la agricultura pampeana, 1950-1984*. Ministerio de Educación y Justicia de la Nación, Secretaría de Cultura.
- Denton, J. E. (2007). PUBLIC HEALTH GOALS FOR CHEMICALS IN DRINKING WATER: GLYPHOSATE. Available at: [www.oehha.ca.gov](http://www.oehha.ca.gov).
- Dill, G. M., Sammons, R. D., Feng, P. C. C., Kohn, F., Kretzmer, K., Mehrsheikh, A., et al. (2010). “Glyphosate: Discovery, Development, Applications, and Properties,” in *Glyphosate Resistance in Crops and Weeds* (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.), 1–33. doi:10.1002/9780470634394.ch1.
- Druille, M., Cabello, M. N., Omacini, M., and Golluscio, R. A. (2013). Glyphosate reduces spore viability and root colonization of arbuscular mycorrhizal fungi. *Appl. Soil Ecol.* 64, 99–103. doi:https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.10.007.

- Eevers, N., White, J. C., Vangronsveld, J., and Weyens, N. (2017). "Bio- and Phytoremediation of Pesticide-Contaminated Environments," in, 277–318. doi:10.1016/bs.abr.2017.01.001.
- Everett, K. D. E., and Dickerson, H. W. (2003). Ichthyophthirius multifiliis and Tetrahymena thermophila tolerate glyphosate but not a commercial herbicidal formulation. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 70, 731–738. doi:10.1007/s00128-003-0044-y.
- FAO SPECIFICATIONS AND EVALUATIONS FOR PLANT PROTECTION PRODUCTS (2001).
- Feng, P. C. C., Cajacob, C. A., Martino-Catt, S. J., Cerny, R. E., Elmore, G. A., Heck, G. R., et al. (2010). "Glyphosate-Resistant Crops: Developing the Next Generation Products," in *Glyphosate Resistance in Crops and Weeds* (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.), 45–65. doi:10.1002/9780470634394.ch3.
- Ferrer, A. (2004). *La economía argentina*. Buenos Aires : Fondo de Cultura Económica.
- Fomsgaard, I. S., Spliid, N. H. H., and Felding, G. (2003). Leaching of Pesticides Through Normal-Tillage and Low-Tillage Soil—A Lysimeter Study. II. Glyphosate. *J. Environ. Sci. Heal. Part B* 38, 19–35. doi:10.1081/PFC-120016603.
- Franz, J. E., Mao, M. K., and Sikorski, J. (1997). *Glyphosate: A Unique Global Herbicide*. ACS monogr. Washington, DC: American Chemical Society.
- Funke, T., Han, H., Healy-Fried, M. L., Fischer, M., and Schonbrunn, E. (2006a). Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 13010–13015. doi:10.1073/pnas.0603638103.
- Funke, T., Han, H., Healy-Fried, M. L., Fischer, M., and Schönbrunn, E. (2006b). Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 13010–5. doi:10.1073/pnas.0603638103.
- Gan, S., Lau, E. V., and Ng, H. K. (2009). Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *J. Hazard. Mater.* 172, 532–549. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.07.118.
- García, F. O., and González, M. F. (2015). "Consumo de fertilizantes en el mundo y en la Argentina," in *Sustentabilidad de los Agrosistemas y Uso de Fertilizantes*, 61–84.
- Gaupp-Berghausen, M., Hofer, M., Rewald, B., and Zaller, J. G. (2015). Glyphosate-based herbicides reduce the activity and reproduction of earthworms and lead to increased soil nutrient concentrations. *Sci. Rep.* 5, 1–9. doi:10.1038/srep12886.
- Gerhardt, K. E., Gerwing, P. D., and Greenberg, B. M. (2017). Opinion: Taking phytoremediation from



- proven technology to accepted practice. *Plant Sci.* 256, 170–185. doi:10.1016/j.plantsci.2016.11.016.
- Gerhardt, K., Huang, X., Glick, B., and Greenberg, B. (2009). Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges. *Plant Sci.* 176, 20–30. doi:10.1016/j.plantsci.2008.09.014.
- Ghersa, C. M., De la Fuente, E., Suarez, S., and Leon, R. J. C. (2002). Woody species invasion in the rolling pampa grasslands, Argentina. *Agric. Ecosyst. Environ.* 88, 271–278. doi:10.1016/S0167-8809(01)00209-2.
- Ghori, Z., Iftikhar, H., Bhatti, M. F., Nasar-Um-Minullah, Sharma, I., Kazi, A. G., et al. (2015). *Phytoextraction: The Use of Plants to Remove Heavy Metals from Soil*. Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-803158-2.00015-1.
- Gimsing, A. L., and Borggaard, O. K. (2002). Competitive adsorption and desorption of glyphosate and phosphate on clay silicates and oxides. 509–515. doi:10.1180/0009855023730049.
- Gimsing, A. L., Szilas, C., and Borggaard, O. K. (2007). Sorption of glyphosate and phosphate by variable-charge tropical soils from Tanzania. 138, 127–132. doi:10.1016/j.geoderma.2006.11.001.
- Gkorezis, P., Daghighi, M., Franzetti, A., Van Hamme, J. D., Sillen, W., and Vangronsveld, J. (2016). The interaction between plants and bacteria in the remediation of petroleum hydrocarbons: An environmental perspective. *Front. Microbiol.* 7. doi:10.3389/fmicb.2016.01836.
- Glick, B. R. (2010). Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotechnol. Adv.* 28, 367–74. doi:10.1016/j.biotechadv.2010.02.001.
- Green, J. M. (2016). The rise and future of glyphosate and glyphosate-resistant crops. *Pest Manag. Sci.* 74, 1035–1039. doi:10.1002/ps.4462.
- Griesinger, L. M., Evans, S. C., and Rypstra, A. L. (2011). Effects of a glyphosate-based herbicide on mate location in a wolf spider that inhabits agroecosystems. *Chemosphere* 84, 1461–1466. doi:https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.04.044.
- Guyton, K. Z., Loomis, D., Grosse, Y., El Ghissassi, F., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., et al. (2015). Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. *Lancet Oncol.* 16, 490–491. doi:10.1016/S1470-2045(15)70134-8.
- Hartmann, A., Rothballer, M., and Schmid, M. (2008). Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere

- microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant Soil* 312, 7–14. doi:10.1007/s11104-007-9514-z.
- Helmer, S. H., Kerbaol, A., Aras, P., Jumarie, C., and Boily, M. (2015). Effects of realistic doses of atrazine, metolachlor, and glyphosate on lipid peroxidation and diet-derived antioxidants in caged honey bees (*Apis mellifera*). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 8010–8021. doi:10.1007/s11356-014-2879-7.
- Hussain, S., Siddique, T., Saleem, M., Arshad, M., and Khalid, A. (2009). *Impact of Pesticides on Soil Microbial Diversity , Enzymes , and Biochemical Reactions*. 1st ed. Elsevier Inc doi:10.1016/S0065-2113(09)01005-0.
- ICCS (2006). Manual for Biological Remediation Techniques. *Int. Cent. Soil Contam. Sites*, 81.
- Imbellone, P. A., Gimenez, J. E., & Panigatti, J. L. (2015). SUELOS DE LA REGION PAMPEANA Procesos de formación. *Inta*, 18288 1, 33. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- International Agency for Research on Cancer (2014). IARC Monographs Volume 112: evaluation of five organophosphate insecticides and herbicides. *Environ. Heal.* 112, 425–433. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.03.104.
- Johal, G. S., and Huber, D. M. (2009). Glyphosate effects on diseases of plants. *Eur. J. Agron.* 31, 144–152. doi:10.1016/j.eja.2009.04.004.
- Kawate, M. K., Colwell, S. G., Alex G. Ogg, J., and Kraft, J. M. (1997). Effect of Glyphosate-Treated Henbit (*Lamium amplexicaule*) and Downy Brome (*Bromus tectorum*) on *Fusarium solani* f. sp. pisi and *Pythium ultimum*. *Weed Sci.* 45, 739–743. Available at: <http://www.jstor.org/stable/4045904>.
- Khan, F. I., Husain, T., and Hejazi, R. (2004). An overview and analysis of site remediation technologies. *J. Environ. Manage.* 71, 95–122. doi:10.1016/j.jenvman.2004.02.003.
- Kuppusamy, S., Palanisami, T., Megharaj, M., Venkateswarlu, K., and Naidu, R. (2016). *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 236*. doi:10.1007/978-3-319-20013-2.
- Lalevic, B., Raicevic, V., Kikovic, D., and Talaiekhosani, A. (2016). Exploiting Microorganisms for the Removal of Organic Pollutants : An Environmental Perspective. *6th Natl. 1st Int. Conf. Appl. Chem. Adv. Technol.*, 1–16.
- Lim, M. W., Lau, E. Von, and Poh, P. E. (2016). A comprehensive guide of remediation technologies for oil contaminated soil — Present works and future directions. *Mar. Pollut. Bull.* 109, 14–45.

- doi:10.1016/j.marpolbul.2016.04.023.
- Limmer, M., and Burken, J. (2016). Phytovolatilization of Organic Contaminants. *Environ. Sci. Technol.* 50, 6632–6643. doi:10.1021/acs.est.5b04113.
- Liu, P. (2017). *The future of food and agriculture: Trends and challenges*. doi:ISBN 978-92-5-109551-5.
- Lombardo, P. B. (2014). “Cambios tecnológicos: Sistema Agroalimentario Argentino,” in *Agroecosistemas. Caracterización, implicancias ambientales y socioeconómicas* (Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Editorial Facultad de Agronomía), 147–167.
- Maeda, H., and Dudareva, N. (2012). The shikimate pathway and aromatic amino Acid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63, 73–105. doi:10.1146/annurev-arplant-042811-105439.
- Maitre, M. I., Lorenzatti, E., Lenardón, A., and Enrique, S. (2008). Adsorción-Desorción de Glifosato en dos Suelos Argentinos. *Nat. Neotrop.* 1, 19–31. doi:10.14409/natura.v1i39.3866.
- Maric, M., Antonijevic, M., and Alagic, S. (2013). The investigation of the possibility for using some wild and cultivated plants as hyperaccumulators of heavy metals from contaminated soil. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 1181–1188. doi:10.1007/s11356-012-1007-9.
- Matteucci, S. D. (2015). Ecorregión Pampa.
- McVey, K. A., Snapp, I. B., Johnson, M. B., Negga, R., Pressley, A. S., and Fitsanakis, V. A. (2016). Exposure of *C. elegans* eggs to a glyphosate-containing herbicide leads to abnormal neuronal morphology. *Neurotoxicol. Teratol.* 55, 23–31. doi:https://doi.org/10.1016/j.ntt.2016.03.002.
- Megharaj, M., and Naidu, R. (2017). Soil and brownfield bioremediation. *Microb. Biotechnol.* 10, 1244–1249. doi:10.1111/1751-7915.12840.
- Mikkelsen, C. A. (2008). La expansión de la soja y su relación con la agricultura industrial. *Rev. Univ. Geogr.* 17, 165–188. Available at: [http://bibliotecadigital.uns.edu.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1852-42652008001100008&nrm=iso](http://bibliotecadigital.uns.edu.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1852-42652008001100008&nrm=iso).
- Min, J., Wang, B., and Hu, X. (2017). Effect of inoculation of *Burkholderia* sp. strain SJ98 on bacterial community dynamics and para-nitrophenol, 3-methyl-4-nitrophenol, and 2-chloro-4-nitrophenol degradation in soil. *Sci. Rep.* 7, 1–10. doi:10.1038/s41598-017-06436-0.
- Mirande, L., Haramboure, M., Smagghe, G., Piñeda, S., and Schneider, M. I. (2010). Side-effects of glyphosate on the life parameters of *Eriopis connexa* (Coleoptera: Coccinellidae) in Argentina. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* 75, 367–372.

- Monsanto Company (2004). Monsanto Roundup ® Original HERBICIDE Complete Directions for Use AVOID CONTACT OF HERBICIDE WITH FOLIAGE, GREEN STEMS, EXPOSED NON-WOODY ROOTS OR FRUIT OF CROPS (EXCEPT AS SPECIFIED FOR INDIVIDUAL ROUNDUP READY ® CROPS), DESIRABLE PLANTS AND TREES, BECAU. Available at: <https://45ijagbx6du4albwj3e23cj1-wpengine.netdna-ssl.com/wp-content/uploads/Roundup-Original.pdf>.
- Myers, J. P., Antoniou, M. N., Blumberg, B., Carroll, L., Colborn, T., Everett, L. G., et al. (2016). Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement. *Environ. Heal.* 15, 19. doi:10.1186/s12940-016-0117-0.
- Okada, E., Costa, J. L., and Bedmar, F. (2016). Adsorption and mobility of glyphosate in different soils under no-till and conventional tillage. *Geoderma* 263, 78–85. doi:10.1016/j.geoderma.2015.09.009.
- Padgett, S. R., Taylor, N. B., Nida, D. L., Bailey, M. R., MacDonald, J., Holden, L. R., et al. (1996). The composition of glyphosate-tolerant soybean seeds is equivalent to that of conventional soybeans. *J. Nutr.* 126, 702–716. doi:dx.doi.org/10.1021/jf950304i.
- Panigatti, L. (2010). *Argentina 200 años, 200 suelos.*, ed. Ediciones INTA.
- Pengue, W. A. (2014). Cambios y escenarios en la agricultura argentina del siglo xxi.
- Pérez, D. J., Okada, E., De Gerónimo, E., Menone, M. L., Aparicio, V. C., and Costa, J. L. (2017). Spatial and temporal trends and flow dynamics of glyphosate and other pesticides within an agricultural watershed in Argentina. *Environ. Toxicol. Chem.* 36, 3206–3216. doi:10.1002/etc.3897.
- Pérez, G. L., Torremorell, a, Mugni, H., Rodríguez, P., Solange Vera, M., do Nascimento, M., et al. (2007). Effects of the herbicide Roundup on freshwater microbial communities: a mesocosm study. *Ecol. Appl.* 17, 2310–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18213971>.
- Peruzzo, P. J., Porta, A. A., and Ronco, A. E. (2008). Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environ. Pollut.* 156, 61–66. doi:10.1016/j.envpol.2008.01.015.
- Pesce, S., Batisson, I., Bardot, C., Portelli, C., Montuelle, B., and Bohatier, J. (2009). Ecotoxicology and Environmental Safety Response of spring and summer riverine microbial communities following glyphosate exposure. 72, 1905–1912. doi:10.1016/j.ecoenv.2009.07.004.
- Pessagno, R. C., Torres Sánchez, R. M., and dos Santos Afonso, M. (2008). Glyphosate behavior at soil and mineral-water interfaces. *Environ. Pollut.* 153, 53–59. doi:10.1016/j.envpol.2007.12.025.

- Piccolo, A., Celano, G., and Conte, P. (1996). Adsorption of glyphosate by humic substances. *J. Agric. Food Chem.* 44, 2442–2446. doi:10.1021/jf950620x.
- Pórfido, E., and Butler, E. (2014). *Los Plaguicidas en la República Argentina*.
- Powles, S. B., Sauer, J. D., Jd, M., and Likewise, L. (2008). Evolved glyphosate-resistant weeds around the world : lessons to be learnt. 365, 360–365. doi:10.1002/ps.
- Primost, J. E., Marino, D. J. G., Aparicio, V. C., Costa, J. L., and Carriquiriborde, P. (2017). Glyphosate and AMPA, “pseudo-persistent” pollutants under real-world agricultural management practices in the Mesopotamic Pampas agroecosystem, Argentina. *Environ. Pollut.* 229, 771–779. doi:10.1016/j.envpol.2017.06.006.
- Que, Q., Chilton, M.-D. M., de Fontes, C. M., He, C., Nuccio, M., Zhu, T., et al. (2010). Trait stacking in transgenic crops: Challenges and opportunities. *GM Crops* 1, 220–229. doi:10.4161/gmcr.1.4.13439.
- Rampoldi, E. A., Hang, S., and Barriuso, E. (2014). Carbon-14-Glyphosate Behavior in Relationship to Pedoclimatic Conditions and Crop Sequence. *J. Environ. Qual.* 43, 558. doi:10.2134/jeq2013.09.0362.
- Reboratti, C. (2010). Un mar de soja : la nueva agricultura en Argentina y sus consecuencias 1. *Rev. Geogr. Norte Gd.* 76, 63–76. doi:10.4067/S0718-34022010000100005.
- Reichenauer, T. G., and Germida, J. J. (2008). Phytoremediation of organic contaminants in soil and groundwater. *ChemSusChem* 1, 708–17. doi:10.1002/cssc.200800125.
- Ritter, W. F., and Scarborough, R. W. (1995). A review of bioremediation of contaminated soils and groundwater. *J. Environ. Sci. Heal. Part A Environ. Sci. Eng. Toxicol.* 30, 333–357. doi:10.1080/10934529509376204.
- Roberts, D. M., Buckley, N. A., Mohamed, F., Eddleston, M., Daniel, A., Mehrsheikh, A., et al. (2010). A prospective observational study of the clinical toxicology of glyphosate-containing herbicides in adults with acute self- poisoning. *Clin. Toxicol.* 48, 129–136. doi:10.3109/15563650903476491.
- Robertson, G. P., and Vitousek, P. M. (2009). Nitrogen in Agriculture: Balancing the Cost of an Essential Resource. *Annu. Rev. Environ. Resour.* 34, 97–125. doi:10.1146/annurev.environ.032108.105046.
- Roccatagliata, J. (1992). *La Argentina: Geografía general y los marcos regionales* Title. 2nd editio. , ed. Buenos Aires: Grupo Editorial Planeta Argentina. Grupo Editorial Planeta Argentina.

- Romano, R. M., Romano, M. A., Bernardi, M. M., Furtado, P. V., and Oliveira, C. A. (2010). Prepubertal exposure to commercial formulation of the herbicide glyphosate alters testosterone levels and testicular morphology. *Arch. Toxicol.* 84, 309–317. doi:10.1007/s00204-009-0494-z.
- Ronco, A. E., Marino, D. J. G., Abelando, M., Almada, P., and Apartin, C. D. (2016). Water quality of the main tributaries of the Paraná Basin: glyphosate and AMPA in surface water and bottom sediments. *Environ. Monit. Assess.* 188. doi:10.1007/s10661-016-5467-0.
- Ruberto, L., Dias, R., Lo Balbo, A., Vazquez, S. C., Hernandez, E. A., and Mac Cormack, W. P. (2009). Influence of nutrients addition and bioaugmentation on the hydrocarbon biodegradation of a chronically contaminated Antarctic soil. *J. Appl. Microbiol.* 106, 1101–1110. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.04073.x.
- Saez, J. M., Álvarez, A., Benimeli, C. S., and Amoroso, M. J. (2014). Enhanced lindane removal from soil slurry by immobilized *Streptomyces* consortium. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 93, 63–69. doi:10.1016/j.ibiod.2014.05.013.
- Sandermann, H. (1992). Plant metabolism of xenobiotics. *Trends Biochem. Sci.* 17, 82–84. doi:10.1016/0968-0004(92)90507-6.
- Sasal, M. C., Demonte, L., Cislighi, A., Gabioud, E. A., Oszust, J. D., Wilson, M. G., et al. (2015). Glyphosate loss by runoff and its relationship with phosphorus fertilization. *J. Agric. Food Chem.* 63, 4444–4448. doi:10.1021/jf505533r.
- Satorre, E. H. (2005). Cambios tecnológicos en la agricultura argentina actual. *Cienc. hoy* 15, 6.
- Schneider, M. I., Sanchez, N., Pineda, S., Chi, H., and Ronco, A. (2009). Impact of glyphosate on the development, fertility and demography of *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae): Ecological approach. *Chemosphere* 76, 1451–1455. doi:https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.05.029.
- Schnoor, J. L. (2002). Phytoremediation of Soil and Groundwater. Technology Evaluation Report. Ground-Water Remediation Technologies Analysis Center (GWRTAC), Iowa City, IA.
- Schönbrunn, E., Eschenburg, S., Shuttleworth, W. A., Schloss, J. V., Amrhein, N., Evans, J. N., et al. (2001). Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 1376–80. doi:10.1073/pnas.98.4.1376.
- Schuette, J. (1998). Environmental fate of glyphosate. *Environ. Monit. Pest Manag. - Dep. Pestic. Regul.* Sacramento, 13 p.

- Segura, A., and Ramos, J. L. (2013). Plant-bacteria interactions in the removal of pollutants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 24, 467–73. doi:10.1016/j.copbio.2012.09.011.
- Segura, A., Rodríguez-Conde, S., Ramos, C., and Ramos, J. L. (2009). Bacterial responses and interactions with plants during rhizoremediation. *Microb. Biotechnol.* 2, 452–64. doi:10.1111/j.1751-7915.2009.00113.x.
- Singh, M., Srivastava, P. K., Jaiswal, V. K., and Kharwar, R. N. (2016). Biotechnological Applications of Microbes for the Remediation of Environmental Pollution. *Biotechnol. Trends Appl.*
- Sluijs, H. van der. (1971). Native grasslands of the Mesopotamia region of Argentina. *Neth J Agr Sci.*
- Stachowski-haberkorn, S., Becker, B., Marie, D., Haberkorn, H., Coroller, L., and De, D. (2008). Impact of Roundup on the marine microbial community , as shown by an in situ microcosm experiment. 89, 232–241. doi:10.1016/j.aquatox.2008.07.004.
- Stenrod, M., Charnay, M., Benoit, P., and Eklo, O. (2006). Spatial variability of glyphosate mineralization and soil microbial characteristics in two Norwegian sandy loam soils as affected by surface topographical features. *Soil Biol. Biochem.* 38, 962–971. doi:10.1016/j.soilbio.2005.08.014.
- Sun, J., Pan, L., Tsang, D. C. W., Zhan, Y., Zhu, L., and Li, X. (2018). Organic contamination and remediation in the agricultural soils of China: A critical review. *Sci. Total Environ.* 615, 724–740. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.09.271.
- Sviridov, A. V., Shushkova, T. V., Ermakova, I. T., Ivanova, E. V., Epiktetov, D. O., and Leontievsky, A. A. (2015). Microbial degradation of glyphosate herbicides (Review). *Appl. Biochem. Microbiol.* 51, 188–195. doi:10.1134/S0003683815020209.
- Székács, A., and Darvas, B. (2012). Forty Years with Glyphosate. *Herbic. Synth. Control weeds*, 247–284. doi:10.5772/32491.
- Thijs, S., Sillen, W., Weyens, N., and Vangronsveld, J. (2017). Phytoremediation: State-of-the-art and a key role for the plant microbiome in future trends and research prospects. *Int. J. Phytoremediation* 19, 23–38. doi:10.1080/15226514.2016.1216076.
- Truu, J., Truu, M., Espenberg, M., Nõlvak, H., and Juhanson, J. (2015). Phytoremediation And Plant-Assisted Bioremediation In Soil And Treatment Wetlands: A Review. *Open Biotechnol. J.* 9, 85–92. doi:10.2174/1874070720150430E009.
- Tsui, M. T. K., and Chu, L. M. (2003). Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison

- between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere* 52, 1189–97. doi:10.1016/S0045-6535(03)00306-0.
- Valverde, B. E. (2010). “Glyphosate Resistance in Latin America,” in *Glyphosate Resistance in crops and weeds*, ed. V. K. Nandula (Hoboken, New Jersey: Wiley & Sons, Inc.), 249–280.
- Vangronsveld, J., Herzig, R., Weyens, N., Boulet, J., Adriaensen, K., Ruttens, A., et al. (2009). Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 16, 765–794. doi:10.1007/s11356-009-0213-6.
- Vera, M. S., Lagomarsino, L., Sylvester, M., Pérez, G. L., Rodríguez, P., Mugni, H., et al. (2010). New evidences of Roundup®(glyphosate formulation) impact on the periphyton community and the water quality of freshwater ecosystems. *Ecotoxicology* 19, 710–721. doi:10.1007/s10646-009-0446-7.
- Vereecken, H. (2005). Mobility and leaching of glyphosate: A review. *Pest Manag. Sci.* 61, 1139–1151. doi:10.1002/ps.1122.
- Verrell, P., and Van Buskirk, E. (2004). As the Worm Turns: *Eisenia fetida* Avoids Soil Contaminated by a Glyphosate-Based Herbicide. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 72, 219–224. doi:10.1007/s00128-003-9134-0.
- Viglizzo, E. ., Lértora, F., Pordomingo, a. ., Bernardos, J. ., Roberto, Z. ., and Del Valle, H. (2001). Ecological lessons and applications from one century of low external-input farming in the pampas of Argentina. *Agric. Ecosyst. Environ.* 83, 65–81. doi:10.1016/S0167-8809(00)00155-9.
- Viglizzo, E. E. F., and Jobbágy, E. (2010). Expansión de la Frontera Agropecuaria en Argentina y su Impacto Ecológico-Ambiental. *INTA, Buenos Aires, Argentina*, 79 p.
- Vila-Aiub, M. M., Vidal, R. A., Balbi, M. C., Gundel, P. E., Trucco, F., and Ghera, C. M. (2008). Glyphosate-resistant weeds of South American cropping systems: an overview. *Pest Manag. Sci.* 64, 366–371. doi:10.1002/ps.1488.
- Waller, A. S., Cox, E. E., and Edwards, E. A. (2004). Perchlorate-reducing microorganisms isolated from contaminated sites. *Environ. Microbiol.* 6, 517–527. doi:10.1111/j.1462-2920.2004.00598.x.
- Wang, L., Chi, X. Q., Zhang, J. J., Sun, D. L., and Zhou, N. Y. (2014). Bioaugmentation of a methyl parathion contaminated soil with *Pseudomonas* sp. strain WBC-3. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 87, 116–121. doi:10.1016/j.ibiod.2013.11.008.
- Wang, Y., Ezemaduka, A. N., Li, Z., Chen, Z., and Song, C. (2017). Joint Toxicity of Arsenic, Copper and



Glyphosate on Behavior, Reproduction and Heat Shock Protein Response in *Caenorhabditis elegans*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 98, 465–471. doi:10.1007/s00128-017-2042-5.

Yadava, P., Abhishek, A., Singh, R., Singh, I., Kaul, T., Pattanayak, A., et al. (2017). Advances in Maize Transformation Technologies and Development of Transgenic Maize. *Front. Plant Sci.* 7, 1–12. doi:10.3389/fpls.2016.01949.

---

## Capítulo 2 - Plan de tesis

---

## **2.1 Contexto actual de la problemática de contaminación con glifosato, objetivos generales y particulares del plan de tesis**

El modelo de producción agrícola que prevalece en la región de la Pampa Húmeda Argentina conlleva, entre otras problemáticas, un uso intensivo de insumos, principalmente agroquímicos. Como consecuencia, toneladas de estos agroquímicos y sus productos de degradación son volcados a lo largo de toda su extensión territorial, entre los cuales el glifosato destaca como el más utilizado. Así, además de permanecer residualmente en los suelos agrícolas, alcanzan diferentes cuerpos de agua poniendo en riesgo tanto la salud humana como el equilibrio de los ecosistemas.

La tensión que se genera entre la fuerte dependencia de glifosato por parte del sector agrícola y la creciente preocupación colectiva por las consecuencias ambientales, sociales y a la salud humana que éste provoca, requiere de una solución que tenga en cuenta las características de estos dos escenarios. No resulta viable, a priori, plantear un cambio disruptivo en el modelo productivo, sino más bien acompañar su transformación hacia un modelo sustentable que integre los aspectos ambientales como variables inseparables de los agroecosistemas.

Considerando las grandes extensiones de las tierras de cultivo y la necesidad de preservar la textura y calidad sus suelos, las tecnologías de fitorremediación surgen como alternativas de posibles soluciones. Esto se da principalmente por su posibilidad de implementación in-situ, su bajo costo de aplicación y mantenimiento, por ser socialmente aceptadas, fáciles de manejar por los productores agrícolas y que podrían representar, eventualmente, una serie de beneficios adicionales en términos agronómicos.

Teniendo en cuenta la fuerte retención del glifosato por parte de las arcillas del suelo, su baja metabolización por parte de las plantas y, su dificultad para atravesar barreras celulares, la rizorremediación es la modalidad de fitorremediación más adecuada al momento de evaluar una eventual estrategia de aplicación.

Entre los primeros pasos al momento de implementar una estrategia de rizorremediación a gran escala, se encuentra la selección de una especie vegetal tolerante a los niveles de contaminante usualmente hallados en suelo (en este caso el glifosato).

Así, una vez implantada la especie vegetal tolerante, su aporte a la dinámica hídrica del suelo y la influencia que sus exudados radiculares tengan sobre las comunidades microbianas -efecto rizosférico- serán los mayores estimulantes de la degradación del contaminante.

Para maximizar el proceso de degradación, es conveniente contar con uno o varios microorganismos tolerantes y degradadores de glifosato, capaces de establecerse en la raíz de la planta tolerante seleccionada y de esa forma alcanzar al agroquímico directamente en el suelo. Disponer de estos microorganismos le dará a la estrategia de rizorremediación una mayor probabilidad de éxito. La actividad promotora directa y/o indirecta de crecimiento vegetal que posean dichos microorganismos, sumará también un efecto positivo, y eventualmente sinérgico sobre la especie vegetal seleccionada.

Por último, para tener una primera aproximación de cómo se comporta en un sistema complejo el modelo planta-microorganismo diseñado, y que variables pueden afectarlo, se deben llevar a cabo experimentos de microcosmos a escala de laboratorio bajo condiciones controladas.

En este contexto, el objetivo general del presente trabajo de tesis es generar el conocimiento que permita desarrollar un sistema planta-microorganismo (rizorremediación) capaz de mitigar el impacto asociado al uso de glifosato en suelos de la Pampa Húmeda Argentina bajo explotación agrícola intensiva.

Para alcanzar dicho objetivo general, fueron propuestos entonces los siguientes objetivos específicos:

1. Bioprospección de especies vegetales de valor productivo para ser evaluadas respecto a su tolerancia a glifosato.
2. Desarrollo e implementación de metodologías para la evaluación de tolerancia a nivel radicular y foliar en dichas especies vegetales.
3. Optimización de un método analítico para medir ácido shikímico en tejidos vegetales como un biomarcador de exposición al glifosato.
4. Aislamiento y caracterización tanto fenotípica como genotípica de bacterias tolerantes y degradadoras de glifosato.
5. Evaluación de las capacidades promotoras del crecimiento de las plantas (PGP) de los microorganismos obtenidos en el punto 4.

6. Evaluación de la capacidad de las cepas degradadoras aisladas para colonizar la raíz de las especies vegetales candidatas.
7. Secuenciación del genoma de la o las cepas que presenten mayor interés mediante la plataforma ION TORRENT® y posterior análisis bioinformático.
8. Evaluación de la eficiencia de biodegradación de diferentes sistemas rizorremediación propuestos mediante ensayos de microcosmos.

---

## **Capítulo 3 - Estudios de tolerancia a glifosato en especies vegetales de valor productivo**

---

### 3.1 Introducción

#### 3.1.1 Prospección de especies vegetales para su uso en estrategias de fitorremediación

Para ser utilizada en un proceso de fitorremediación, la especie vegetal seleccionada debe cumplir con una serie de características, no solamente relacionadas con la respuesta al xenobiótico sino también con el contexto, generalmente complejo, en el cuál este proceso desea implementarse.

Según la *Environmental Protection Agency* (EPA, 2000), al momento de elegir una especie vegetal para este tipo de procesos debemos considerar tres aspectos generales, dando preferencia a:

- Especies vegetales anteriormente reportadas como capaces de metabolizar o tolerar el contaminante a remediar.
- Especies de fácil implantación, gran producción de biomasa en general y particularmente radicular, que presenten facilidad para su manejo y reproducción.
- El uso de especies nativas, especialmente aquellas que presenten un valor productivo, como cultivos o forrajes, disponibles comercialmente y en cantidad suficiente para cumplir con las demandas del protocolo a implementar.

En cualquiera de los casos, el sistema radicular de la planta debe presentar una relación adecuada entre su superficie y el volumen de suelo a remediar, a fin de maximizar el área de contacto entre el xenobiótico y el sistema remediador. Además, debe alcanzar la profundidad en el perfil de suelo donde se encuentra distribuido dicho xenobiótico. Paralelamente, es importante el grado de adaptación a los distintos tipos de estrés, bióticos o abióticos, a los que la especie implantada pueda estar expuesta en el sitio a remediar (ej.: salinidad del suelo, acidez del suelo, sequías, anegamientos, heladas, herbivoría y enfermedades endémicas).

Existen también requerimientos respecto del manejo agronómico que merecen ser tenidos en cuenta, como la necesidad de fertilización, fenología, riego, cobertura, volumen de producción, tasa de crecimiento, método de implantación, estabilidad de la especie en el lote, la posibilidad de implementar cultivos de especies mixtas, versus la implantación de monocultivos, entre otros.

En cuanto a los aspectos particulares que fueron considerados al momento de realizar la prospección de especies vegetales para llevar a cabo una estrategia de rizorremediación de glifosato en la extensión del territorio de la Pampa Húmeda, se mencionan:

La especie vegetal a ser elegida no debiera interferir con la actividad productiva principal por lo que, en el caso de tratarse de un lote dedicado a la producción agrícola, no debe ocupar los suelos productivos en detrimento del uso de éstos para el cultivo principal. A su vez, de tratarse de un lote abocado a la producción mixta (agrícola y ganadera), la especie vegetal debe representar una adecuada y atractiva opción para el pastoreo. En este contexto, aquellas especies forrajeras capaces de ser utilizadas en interseembra o en los bordes del lote, de existir cultivos principales en éstos, resultan la elección más lógica. De esta manera no solo se evita interferir con las principales actividades económicas, sino que se presenta como una fuente adicional de explotación, ya que la pastura implantada podría potencialmente ser fuente nutricional del ganado de manera directa (mediante pastoreo) o indirecta (mediante henaje) y proveedora de servicios ecosistémicos.

En términos logísticos, deben seleccionarse preferentemente forrajes que estén disponibles comercialmente para la Pampa Húmeda, lo que resolvería un gran escollo para el planteo de la estrategia de rizorremediación en un territorio tan vasto, como la disponibilidad, acopio y distribución adecuada de germoplasma. La incorporación de especies vegetales exóticas queda descartada por tal motivo y por requerir del cumplimiento de gran cantidad de normativas para su introducción, además de los efectos ecosistémicos no deseados que usualmente causan al establecerse.

Finalmente, la especie vegetal candidata debe promover la presencia y continuidad del microorganismo, consorcio o biosistema degradador en su entorno rizosférico mediante la secreción de exudados radiculares adecuados, siendo que el perfil de los exudados radiculares varía según la especie. Debe presentar una gran biomasa radicular, que cubra los horizontes O y A, ya que el glifosato ha sido determinado mayoritariamente en éstos por quedar muchas veces retenido, adsorbido a materia orgánica o a partículas de arcilla. Debe además tener un buen nivel de implantación y cobertura, lo que no solo implicaría buena cantidad de materia verde para el pastoreo, sino que implicaría también una mejor densidad radicular, aspecto fuertemente buscado.

### **3.1.2 Selección de especies vegetales candidatas para llevar a cabo ensayos de tolerancia a glifosato**

Como se menciona en el apartado anterior, las especies forrajeras fueron consideradas entre las especies vegetales candidatas a ser parte de la estrategia de rizorremediación, y por lo tanto a ser



evaluadas respecto a su tolerancia a glifosato. Se trabajó con 4 cultivares, *Lotus corniculatus*, *Lotus tenuis*, *Medicago sativa* y *Lolium multiflorum*, todos ellos utilizados en el contexto agro-productivo de la Pampa Húmeda Argentina y de excelente calidad forrajera. A continuación, se presenta la información general más relevante respecto al ciclo de vida, valor productivo y manejo de cada una de las especies:

#### *Lotus sp.*

El género *Lotus* es miembro de la familia *Fabaceae*, y está representado por un total de entre 100 a 130 especies (Escaray et al., 2011) distribuidas a lo largo de todo el globo. Cinco especies son las que poseen carácter productivo, siendo dos de ellas las disponibles comercialmente en la Pampa Húmeda: *Lotus corniculatus* L. (*birdsfoot trefoil*) y *Lotus tenuis* Waldst. et Kit. (= *Lotus glaber* Mill., *narrowleaf trefoil*). Se cree que estas dos especies, provenientes de Europa y Asia menor, fueron introducidas a comienzos del siglo XX (Miñón et al., 1990).

Como especie leguminosa, presentan alta digestibilidad y valor de proteína cruda, además de una mayor homogeneidad en el rendimiento en comparación con las gramíneas. Pueden establecer asociaciones simbióticas con microorganismos, lo que les permiten fijar nitrógeno y así incrementar sus niveles en suelo, y poseen además bajo requerimiento de fósforo, ambas características que pueden incrementar la productividad de áreas donde sean implantados, sobre todo en aquellos sectores bajos del terreno. Es por ello que las especies de *Lotus* son consideradas clave para el manejo de los sistemas ganaderos de la Pampa deprimida (Cambareri et al., 2012). Diferencias morfológicas entre las diferentes especies, fundamentalmente en la estructura de sus raíces, hacen que presenten diferente tipo de adaptación al ambiente (anegamiento, sequía, salinidad, absorción de nutrientes) y, como consecuencia, diferencias en su manejo agronómico.

En cuanto a la producción se refiere, se han reportado rendimientos máximos históricos para *L. corniculatus* de entre 8.000 y 10.000 Kg de materia seca ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>, niveles de productividad que compiten con pasturas de otras leguminosas como alfalfa y trébol, mientras que *L. tenuis*, presenta niveles de productividad menores. En Sudamérica, un total de 1,85 millones de hectáreas son sembradas anualmente con especies del género *Lotus* (Escaray et al., 2011) .

*L. tenuis* compensa las diferencias de rendimiento mostrando una mayor adaptabilidad que *L. corniculatus* en regiones donde predominan el estrés salino e inundaciones. Dentro de la topografía de la Pampa deprimida, los cultivos de *L. tenuis* suelen establecerse en las zonas de media loma y

bajos, mientras que *L. corniculatus* puede habitar la loma, media loma y en menor proporción parte del bajo dulce (Figura 3.1). La posibilidad que tienen ambas especies de habitar diferentes zonas del terreno les da una mayor versatilidad al momento de definir una estrategia de fitorremediación, lo que deriva en mayores posibilidades de éxito.

Ambas especies han sido utilizadas ampliamente en la recuperación, renovación y revegetación de suelos por las características anteriormente mencionadas, contando con gran aceptabilidad a nivel mundial en lo que respecta a procesos ambientales (Beuselinck, 1999). Finalmente, y como dato relevante, existen registros de un cultivar de *L. corniculatus* con tolerancia diferencial a glifosato respecto a otros cultivares de la misma especie (Boerboom et al., 1990; Boerboom et al., 1991).

#### *Medicago sativa.*

La alfalfa es también miembro de la familia *Fabaceae*, ampliamente distribuida a nivel mundial y generalmente referida como la leguminosa de más amplio uso dentro de las forrajeras. Posee gran calidad nutricional, requerida por cualquier sistema de pastoreo, y a su vez contribuye al mejoramiento y recuperación de la fertilidad y estabilidad edáfica por su perennidad, plasticidad y capacidad de fijación simbiótica del nitrógeno atmosférico.

Posee un gran valor productivo, no solo por las características anteriormente mencionadas y por presentar el mayor rendimiento entre las leguminosas forrajeras, sino también porque su ciclo de producción es similar al de cultivos como el maíz y trigo, lo que la hace muy fácil de adaptar. Es así como se estima que la superficie implantada con alfalfa a nivel mundial es de unos 32 millones de hectáreas (Bouton, 2012).

Su sistema radicular tiene una raíz principal bien definida que puede penetrar en el suelo a una profundidad de 3,5 a 4 metros o más, lo que constituye un elemento sumamente positivo en el contexto de la rizorremediación. Los tallos erectos suelen alcanzar una altura de 60 a 90 cm, pudiendo haber más de 25 tallos por planta, que nacen de una corona leñosa. Siendo la tolerancia a sequías una característica positiva, presenta sensibilidad al estrés por anegamiento (ASA, 2004), lo que eventualmente la recluye a zonas de loma y media loma (Figura 3.1).

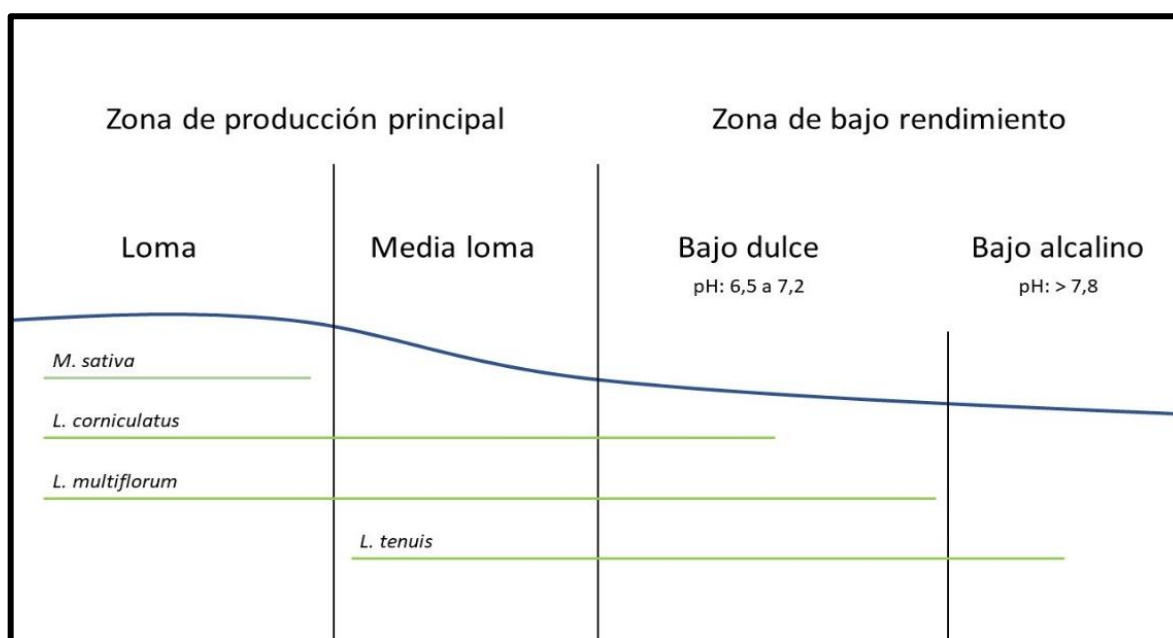
La alfalfa ha demostrado tolerancia y capacidad de detoxificación de diversos contaminantes por lo que se postula como una especie con gran potencial para la fitorremediación (Cuadrado, 2009). Ha sido utilizada en varios ensayos de fitorremediación, (mayoritariamente en procesos de

rizorremediación y fitovolatilización), para compuestos orgánicos entre los que se encuentran derivados del petróleo, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) y pesticidas (Singh et al., 2009).

### *Lolium multiflorum*

*L. multiflorum*, conocido como Ryegrass, Ryegrass anual o Ryegrass italiano en la Argentina, pertenece a la familia de las gramíneas o *Poaceae*. Es de rápida germinación, vigoroso crecimiento, adaptado a las temperaturas subtropicales y de muy fácil manejo. De gran potencial energético, alta palatabilidad y digestibilidad, como característica forrajera distintiva (Hannaway et al., 1999). Su morfología nos muestra hojas brillantes y flexibles, de tallos largos entre las gramíneas, y ligeramente surcados. En cuanto a su raíz, estas son muy superficiales, concentradas mayoritariamente en los primeros 5 centímetros, alcanzando una profundidad promedio de 20 centímetros (Guillet, 1984). En la cuenca del salado fueron reportados rendimientos de 3000 Kg de materia seca ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> (Hagen, 2012).

Se adapta bien a suelos tanto ácidos como alcalinos (en el rango de pH 5.0 a 7.8), y si bien la mejor producción se obtiene en suelos bien drenados, es de las especies forrajeras que pueden tolerar anegamientos (Figura 3.1).



**Figura 3.1.** Zona de implantación de las especies vegetales seleccionadas para llevar a cabo la estrategia de rizorremediación.

*L. multiflorum* y otras especies de *Lolium* se encuentran entre las especies vegetales con más registros de tolerancia a glifosato (Perez and Kogan, 2003; Perez-Jones et al., 2007). Los reportes se han realizado en varios países, incluyendo Australia, Estados Unidos, Brasil, Chile y Argentina; países que utilizan ampliamente la tecnología de cultivos RR (RoundUp Ready Crops).

### **3.1.3 Estudio de tolerancia a glifosato en especies vegetales**

De acuerdo con la Weed Science Society of America, (WSSA), el término “tolerancia” refiere a la capacidad inherente de la especie vegetal a sobrevivir y reproducirse luego del tratamiento con el herbicida, mientras que “resistencia” está definida como la capacidad heredada de una planta para sobrevivir y reproducirse luego de una exposición a una dosis del herbicida que es normalmente letal a un cultivar tipo salvaje. Se reserva entonces el término “resistencia” a procesos que involucren algún tipo de selección o manipulación genética en un determinado cultivar. En este capítulo se adoptará el término “tolerancia” para referirse al estudio de cualquier mecanismo que confiera una respuesta diferencial a glifosato, ya que muchas veces en la bibliografía especializada se reserva el término “resistencia” a eventos transgénicos o a selección a lo largo de varias generaciones.

Los mecanismos que confieren tolerancia a glifosato pueden ser agrupados en dos categorías generales: la tolerancia relacionada al sitio de blanco del glifosato y la tolerancia no relacionada con el sitio blanco del glifosato.

Los mecanismos relacionados al sitio blanco responden a modificaciones que puede sufrir la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato (EPSP) sintasa (EPSPS, EC 2.5.1.19), que es el blanco molecular del glifosato, y que incluyen desde mutaciones que modifican la afinidad de la enzima por el herbicida, hasta el aumento de la expresión, ya sea por la por aumento del número de copias del gen o por la sobreexpresión de una copia única (Dun et al., 2007; Healy-Fried et al., 2007b; Gaines et al., 2010; Gao et al., 2014).

Los mecanismos no relacionados con el sitio blanco están asociados a procesos de absorción/translocación diferencial del herbicida, secuestro y exclusión en los distintos tejidos vegetales (Sammons & Gaines, 2014).

El contexto usual en el cual suele investigarse la tolerancia a glifosato en plantas está relacionado con eventos que ocurren luego de una aplicación recomendada del herbicida a campo, en donde se observa que cierta especie (una determinada cantidad o población de esa especie, en realidad)

“escapa”, sobrevive a la aplicación de una dosis a la que normalmente es sensible. También es común hallar reportes o estudios de tolerancia en especies que, con los años, muestran un predominio en sectores donde el glifosato no es aplicado directamente y donde antes no lo mostraban, como canales, zanjas bordes, etc. (Vila-Aiub et al., 2011).

Bajo este enfoque tradicional, es posible encontrar en literatura una gran cantidad de trabajos que evalúan la tolerancia a glifosato en malezas, clasificados muy convenientemente por Shaner (2010). En dicha clasificación podemos encontrar: ensayos en invernadero y a campo; ensayos de dosis discriminatorias; ensayos de germinación; ensayos basados en el metabolismo de la especie vegetal; ensayos *in vitro*; ensayos basados en el análisis del ADN de la especie vegetal y, por último, absorción y translocación en la especie vegetal de glifosato marcado isotópicamente ( $^{14}\text{C}$ -glifosato).

Si bien ese es el orden lógico en los ensayos que los autores siguen, nunca son ejecutados en su totalidad en un mismo trabajo (Shaner, 2010). Generalmente los reportes de tolerancia a glifosato en malezas suelen comenzar con la adquisición del germoplasma correspondiente a la especie vegetal que escape a la aplicación, para luego llevar a cabo ensayos en invernadero con planta en estado vegetativo, que consisten en la aplicación de una o varias dosis del herbicida en condiciones controladas. Luego se mide una o varias variables de respuesta, como ser peso fresco, peso seco, daño visual, y se comparan los valores con el ecotipo silvestre u otros cultivares. Posteriormente, suelen llevarse a cabo uno o varios ensayos metabólicos, entre los que predomina ampliamente la determinación de shikimato en tejido vegetal como respuesta a una aplicación. El shikimato se acumula en el tejido vegetal como consecuencia de la inhibición por parte del glifosato de la enzima EPSP sintasa (comentarios sobre esta metodología se pueden encontrar en la sección 3.2 y 3.3 de este capítulo). Por último, en función de los recursos del laboratorio e hipótesis con respecto a los mecanismos de tolerancia involucrados, pueden ser ejecutados ensayos como la determinación de la actividad de la enzima EPSPS, extracción de ADN o ARNm para luego analizar la secuencia de EPSPS, o determinar el porcentaje de  $^{14}\text{C}$ -glifosato absorbido y/o translocado luego de aplicar el formulado sobre las hojas de la especie a evaluar. Usualmente, se considera este último ensayo como el de mayor complejidad experimental, tanto en su diseño como en su interpretación.

Para la evaluación de tolerancia en las especies propuestas, se hizo uso de esa organización, bajo un enfoque diferente, orientado a los objetivos específicos planteados en cada caso. Esto es, poder asegurar que la especie o especies evaluadas toleren las dosis del herbicida en las concentraciones y situaciones en las que se enfrentarían usualmente a campo, formando parte de una estrategia de rizadorremediación.

Cuando fue diseñado el protocolo de ensayos para evaluar la tolerancia a glifosato sobre las especies vegetales candidatas, se pensó primero en asegurar la capacidad de germinación y desarrollo de la especie en una matriz conteniendo glifosato, requerimiento básico para cualquier estrategia de rizorremediación de suelos. Luego, y considerando que es posible que la planta sea también expuesta a glifosato por vía foliar, a partir de recibir derivas de máquinas agrícolas por ser parte del lote productivo, se evaluó también la tolerancia en un ensayo de aplicación foliar, determinándose tanto para este ensayo como para el anterior, diferentes índices asociados a variables de respuesta específicas e inespecíficas. Por último, y una vez seleccionada la especie vegetal tolerante, se utilizaron técnicas moleculares para poder indagar más profundamente respecto al origen de la tolerancia observada en la especie vegetal seleccionada.

Durante esta etapa de trabajo se alcanzaron los siguientes objetivos específicos:

1. Bioprospección de especies vegetales de valor productivo para ser evaluadas respecto a su tolerancia a glifosato.
2. Desarrollo e implementación de metodologías para la evaluación de tolerancia a nivel radicular y foliar en dichas especies vegetales.
3. Optimización de un método analítico para medir ácido shikímico en tejidos vegetales como un biomarcador de exposición al glifosato.

## 3.2 Materiales y Métodos

### 3.2.1 Origen del germoplasma

Las especies vegetales utilizadas en los ensayos que se describen a continuación fueron:

- *Lotus corniculatus* (cultivar Gladiador)
- *Lotus tenuis*
- *Medicago sativa* (cultivar Express)
- *Lolium multiflorum* (cultivar Bill Max)

Todas los cultivares fueron gentilmente cedidos por la firma Gentos S.A., empresa originaria de Pergamino, Provincia de Buenos Aires, y especializada en la producción de una gran variedad de especies forrajeras utilizadas en nuestro país. Como se mencionó anteriormente, cuando se diseñan estrategias de fitorremediación a escala campo es deseable el uso de cultivares comerciales respecto de semillas colectadas, ya que permiten contar con una genética conocida y trazable, un buen estado fitosanitario, un método de producción masivo y la logística para su eventual distribución (EPA, 2000). Las semillas de *L. tenuis*, fueron colectadas de un lote que presentó una población que escapó a una aplicación convencional de glifosato y gentilmente cedidas a nuestro grupo por la Dra. Analía Sannazzaro. Por las características excepcionales en las cuales fueron obtenidas dichas semillas, se decidió incluirlas en la evaluación de tolerancia al herbicida. Eventualmente, ya que las características de esta colecta en particular lo ameritan, podría desarrollarse su producción a escala.

### 3.2.2 Esterilización superficial de semillas

Con la intención de evaluar la tolerancia a glifosato sobre cada una de las especies vegetales, evitando la posible interferencia por parte de los hongos y bacterias que naturalmente habitan las semillas, se desarrollaron protocolos de esterilización superficial para cada morfología de semilla de las especies a evaluar.

Una buena técnica de esterilización superficial será entonces, aquella que inhiba el desarrollo de los microorganismos asociados a la semilla sin interferir con su tasa de germinación típica.

Se partió de los protocolos originales de esterilización desarrollados en nuestro laboratorio para germoplasmas similares, siendo luego adaptados y optimizados de acuerdo a la morfología de cada semilla utilizada. Los dos aspectos principales que se tuvieron en cuenta en el diseño del protocolo fueron el origen de la especie vegetal (leguminosa o gramínea) y la estructura y características de la episperma.

Para las leguminosas, el protocolo original consistió en colocar 1,0 mL de semillas en un tubo de 15,0 mL de capacidad, luego agregarle 12,0 mL de etanol 96°, agitar durante 1 minuto y dejar reposar 3 minutos, descartando el etanol. Luego se agregaron 12,0 mL de una solución de NaClO 5% v/v, agitándose en shaker por 30 minutos, y posteriormente se descartó la solución sobrenadante. Por último, se realizaron 5 lavados con 12,0 mL de agua destilada estéril.

Para la gramínea, el protocolo original consistió en colocar 1,0 mL de semillas en un tubo de 15,0 mL de capacidad, luego agregar 12,0 mL de una solución de HgCl<sub>2</sub> 0,1% p/v, agitar 20 minutos en shaker, y descartar la solución, con dos enjuagues con agua destilada estéril. A continuación, se agregó 12,0 mL de etanol 96° y se agitó en shaker por 5 minutos. Por último, se enjuagó 5 veces con 12,0 mL de agua destilada estéril.

Para evaluar la eficacia de cada proceso de esterilización superficial, las semillas fueron sembradas en placas de Petri conteniendo medio Murashige-Skoog (MS) (S3.1.1) (Murashige & Skoog, 1962) con 10 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y 4 g L<sup>-1</sup> de agar, y luego incubadas a 24 ± 1 °C durante 14 días. Cada paso en la optimización del proceso de esterilización fue evaluado utilizando tandas de 50 semillas, las cuales fueron sembradas de 10 en 10 en las cápsulas de Petri conteniendo medio MS. Este medio permite evaluar simultáneamente la capacidad de germinación de las semillas, y su nivel de esterilización superficial.

### 3.2.2.1 Optimización de esterilización de semillas de *L. corniculatus* y *L. tenuis*

La esterilización de semillas de este género se optimizó teniendo en cuenta la necesidad de escarificación de la cutícula que requiere esta especie para estimular su germinación. Para realizar dicha escarificación se utilizó papel de lija con un tamaño de grano de 200 µm. El protocolo de esterilización se basó en el uso secuencial de una solución de etanol y de NaClO, luego del cual se practicaron lavados sucesivos con agua destilada estéril. Fueron optimizados: el grado de abrasión alcanzado durante la escarificación (por observación a la lupa binocular), el orden de los reactivos en



la secuencia, el tiempo de permanencia en cada solución y la concentración de NaClO. El resultado final del proceso de optimización se presenta en el diagrama de flujo de la figura 3.2A.

### 3.2.2.2 Optimización de esterilización de semillas de *L. multiflorum*

El proceso de esterilización superficial para las semillas de *L. multiflorum* consistió en el reemplazo de la solución de NaClO por una de HgCl<sub>2</sub>. La elección de un agente microbicida más potente es necesaria ya que la semilla se encuentra soldada a la carióspside, fruto indehisciente de complejidad estructural que dificulta el accionar de soluciones de NaClO. En el caso de esta semilla, diferentes tiempos de exposición a la solución de HgCl<sub>2</sub> fueron evaluados. El protocolo final se presenta en la figura 3.2B.

### 3.2.2.3 Optimización de esterilización de semillas de *M. sativa*

Partiendo del mismo protocolo original que para las semillas de Lotus, se optimizó el tiempo de exposición y la concentración de la solución de NaClO. El protocolo utilizado durante los ensayos puede verse en la figura 3.2C.

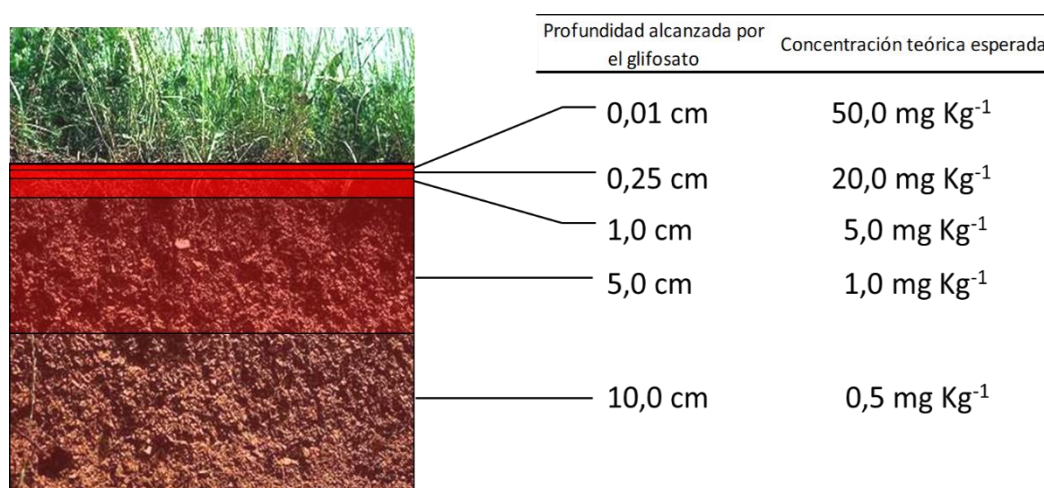


**Figura 3.2.** Diferentes protocolos optimizados para la esterilización superficial de semillas. (A) *Lotus spp.* (B) *L. multiflorum*. (C) *M. sativa*.

### 3.2.3 Ensayo de tolerancia en agar

Con el objetivo de evaluar la tolerancia a glifosato por vía radicular en las diferentes especies vegetales se llevaron a cabo ensayos de tolerancia en medio MS agarizado, asegurando la máxima biodisponibilidad del herbicida.

Para cada especie, se preparó un conjunto de frascos de vidrio de 360 mL conteniendo 50,0 mL de medio MS con 0,8% p/v de agar, con concentraciones crecientes de glifosato (Roundup Ultramax®, Monsanto 74,7% de la sal de amonio). Se ensayaron un total de 5 niveles, cada uno con concentraciones finales de: 0,5, 1,0, 5,0, 20,0 y 50,0 mg Kg<sup>-1</sup>, que corresponden a una dosis de 1 Kg ha<sup>-1</sup> de producto alternativamente distribuido en los primeros 10, 5, 1, 0,25 o 0,01 cm de profundidad del suelo respectivamente, asumiendo una densidad aparente del suelo de 1,5 g ml<sup>-1</sup> (Figura 3.3).



**Figura 3.3.** Relación entre la concentración teórica alcanzada por una dosis fija de glifosato (747 g ha<sup>-1</sup> de sal monoamónica), y el volumen de suelo que la profundidad del perfil representa.

La selección de los rangos de concentración evaluados se basó en una revisión bibliográfica sobre estudios realizados en la Pampa Húmeda y en otras regiones del mundo donde se ha cuantificado glifosato en suelos bajo actividad agrícola (Veiga et al., 2001; Scribner et al., 2007; Peruzzo et al., 2008; Aparicio et al., 2013).

Los frascos conteniendo el medio MS fueron esterilizados en autoclave (20 minutos a 1 atm). Una solución madre de glifosato fue esterilizada por separado mediante filtración (0,20 µm de tamaño de poro) para luego ser agregada a los frascos en distintos volúmenes y así obtener las diferentes concentraciones según el nivel. Se prepararon 5 replicados para cada nivel, sembrándose en cada uno de ellos 10 semillas de cada especie vegetal. Posteriormente se sellaron con film de polietileno. Los

frascos fueron cultivados a  $24 \pm 1$  °C,  $50 \pm 5$  % de humedad relativa y 16 horas de fotoperiodo ( $400 \mu\text{M cm}^{-2}\text{seg}^{-1}$  de intensidad lumínica).

Se registró diariamente el número de germinaciones por frasco y, a tiempo final (28 días), la biomasa y concentración de ácido shikímico en planta entera. De acuerdo con lo reportado por Tong (2009), y teniendo en cuenta que la concentración de ácido shikímico en los tejidos es un indicador preciso de la exposición al glifosato en las plantas (Singh & Shaner, 1998), el índice de tolerancia (Ti) y el índice de exposición (Ei) se calcularon de la siguiente manera:

$$Ti = \frac{Bt}{Bc}$$

Donde *Bt* es la biomasa vegetal promedio del tratamiento y *Bc* es la biomasa vegetal promedio del control (sin aplicación de glifosato).

$$Ei = \frac{Ct}{Cc}$$

Donde *Ct* es la concentración de ácido shikímico promedio del tratamiento y *Cc* es la concentración de ácido shikímico promedio del control (sin aplicación de glifosato).

### 3.2.4 Ensayo de aplicación foliar

Se evaluó la respuesta de las especies vegetales frente a una aplicación foliar, por ser este tipo la forma usual de aplicación del herbicida. La información suministrada por este ensayo permite, por un lado, comparar la respuesta de las especies que se evalúan respecto a las publicadas en otros trabajos de investigación donde se estudia la tolerancia a glifosato y, por el otro, estimar qué nivel de deriva puede soportar cada especie en el caso de ser usado como barrera dentro de un lote bajo producción agrícola.

Para llevar a cabo el ensayo, semillas de *L. corniculatus*, *L. tenuis* y *M. sativa* fueron esterilizadas superficialmente y sembradas en placas de Petri sobre papel de filtro embebido en solución Hoagland (S3.1.2) (Hoagland & Arnon, 1950). Luego de la emergencia de la radícula, 25 plántulas de cada especie fueron trasplantadas manualmente a almácigos con pocillos de  $100 \text{ cm}^3$  de capacidad y con sustrato arena-perlita 1:1. Los almácigos fueron regados con solución Hoagland al medio durante todo el período del ensayo. El ensayo se llevó a cabo en cámara de cultivo vegetal a  $(24 \pm 1)$  °C, humedad relativa de  $50 \pm 5$  % y 16 h de fotoperiodo ( $400 \mu\text{M cm}^{-2}\text{seg}^{-1}$  de intensidad lumínica). Las plantas en

estadio de 5º a 7º hoja fueron asperjadas con glifosato (74,7% la sal de amonio) (Roundup Ultramax®, Monsanto) a dosis de producto equivalentes a 0; 700; 1.400; 2.800 y 5.600 g ha<sup>-1</sup> (Figura 3.4). El pulverizador utilizado para este ensayo disponía de una boquilla plana con un volumen de salida equivalente a 200 L ha<sup>-1</sup> que fue previamente calibrado.

Las dosis comprendidas entre 1.400 y 2.800 g ha<sup>-1</sup> del producto comercial utilizado corresponden a aplicaciones agronómicas típicas de este producto en varios cultivos, según las recomendaciones del fabricante. Una dosis de 700 g ha<sup>-1</sup> representa un valor del 70% de la aplicación mínima recomendada (1.000 g ha<sup>-1</sup>), y puede ser considerada como una fuerte deriva de aplicación.

Catorce días luego de la aplicación se determinó la biomasa de cada plántula y se evaluó el daño producido por el herbicida según un *score* de impacto visual. El tiempo límite del ensayo fue establecido en función del crecimiento de las especies evaluadas. Luego de este tiempo, los individuos (en promedio) comienzan a extender su raíz por fuera del pocillo asignado, mientras que sus partes aéreas pierden rigidez cayendo sobre otras, provocando un efecto de sombreo e impidiendo de esta forma la exposición homogénea a la aplicación.



**Figura 3.4.** Montaje y toma de muestra del ensayo de aplicación foliar.

Como parte del procedimiento estándar de evaluación de la eficacia que los herbicidas tienen sobre las malezas y posibles efectos sobre cultivos, frecuentemente se incluye un *score* de impacto visual. La mayoría de los protocolos de evaluación visual se basan en la experiencia de profesionales y el contexto de aplicación agronómico, pero también es posible encontrar protocolos estandarizados o guías, como el de la Organización Europea y Mediterránea de Protección Fitosanitaria (EPPO Phytotoxicity assessment, 2011). En consecuencia, se diseñó una tabla de *score* visual, para evaluar el impacto de la aplicación durante el desarrollo del ensayo. Dicha escala se basa en considerar signos de fitotoxicidad específicos para las legumbres, dándole una valoración semicuantitativa,

jerarquizándola según el tipo de daño. Para confeccionar la tabla, se contó además con el asesoramiento de la Ing. Agrónoma Jorgelina Ceferina Montoya, reconocida profesional del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) en el área de malezas y manejo herbicidas. La puntuación se estableció de acuerdo con la tabla 3.1, en unidades relativas de score (U). Cada individuo puede tener un mínimo de 0 unidades (ningún daño) y un máximo de 100 (muerte). Aquellas plantas con más de 15 unidades fueron clasificadas como "dañadas irreversiblemente".

**Tabla 3.1.** Score visual utilizado para evaluar el impacto del herbicida en las diferentes especies vegetales.

Síntomas de fitotoxicidad	Score asignado (U)
Clorosis localizada	5
Clorosis extendida	5
Necrosis localizada	20
Defoliación/Necrosis extendida	70

### 3.2.5 Determinación de ácido shikímico y contenido de clorofilas en planta entera

La concentración de shikimato en tejidos vegetales ha sido ampliamente utilizada como un indicador de exposición al glifosato (Singh & Shaner, 1998; Pline et al., 2002b; Henry et al., 2007). El glifosato ejerce su actividad herbicida a través de la inhibición de la 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato (EPSP) sintasa. Esta enzima cataliza la transferencia de un residuo de enolpiruvato desde una molécula de fosfoenolpiruvato (PEP) a una molécula de shikimato-3-fosfato dando como producto una molécula de 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato, paso clave en la síntesis de aminoácidos aromáticos, hormonas y otros metabolitos relevantes (Schmid & Amrhein, 1995; Maeda & Dudareva, 2012). Como consecuencia de esta inhibición enzimática, la concentración de shikimato aumenta en los tejidos vegetales.

A su vez, la determinación de clorofilas totales es utilizada frecuentemente como un indicador general del estado fisiológico vegetal, ya que brinda información sobre la movilización de proteínas y el contenido de nitrógeno en la planta (Maxwell & Johnson, 2000; Carter & Knapp, 2001). En este sentido, esta determinación complementa la determinación de shikimato como indicador específico de la exposición a glifosato.

Para evaluar la cinética de acumulación de ácido shikímico en tejido vegetal, *L. corniculatus* y *L. tenuis* fueron cultivadas en una mezcla de arena-perlita (1:1) en cámara de cultivo a  $24 \pm 1$  °C,  $50 \pm 5$  % de humedad relativa y 16 h de fotoperiodo ( $400 \mu\text{M}^{-2}\text{seg}^{-1}$  de intensidad luminosa). Plantas de entre 5-7 hojas se aplicaron con glifosato (74,7% la sal de amonio) (Roundup Ultramax®, Monsanto) a dosis equivalente de 400 y 1400 g ha<sup>-1</sup> como se ha descrito anteriormente. Ocho plantas por tratamiento

fueron muestreada a los días: 0, 1, 3, 5, 7, 14 y 21 luego de la aplicación, midiéndose las concentraciones de clorofila y ácido shikímico. Cada planta representa una unidad experimental independiente en la cual se realiza entonces, una determinación no destructiva (concentración de clorofilas totales) para luego realizar una determinación destructiva (concentración de ácido shikímico).

El contenido de clorofila se registró usando un medidor portátil de clorofila SPAD 502 (Minolta, Plainfield, EE. UU.). El valor de la clorofila promedio por planta fue obtenido midiendo tres hojas completas y desarrolladas por individuo, con ocho determinaciones para cada unidad experimental por nivel y por tiempo de muestreo. La extracción y el análisis del shikimato se llevó a cabo siguiendo el método original de Cromartie & Polge con modificaciones mínimas (Shaner et al., 2005) (S3.1.3). Brevemente, cada plántula fue congelada en nitrógeno líquido y luego molida en mortero hasta homogeneidad. Luego se colocaron 100 mg de tejido en microtubos de 1,5 ml y se añadió 1,0 ml de HCl 0,25 M. Las muestras luego fueron agitadas en vortex por un minuto, para ser luego centrifugadas a 25.000 x g durante 15 minutos. Se mezclaron 250 µL de sobrenadante con 250 µL de una solución ácido peryódico 0,25% / (meta) peryodato de sodio al 0,25%. La mezcla de reacción se incubó a  $24 \pm 1$  °C durante 30 minutos. A continuación, se añadieron 500 µL de una solución de NaOH 0,6 N / Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 0,22 N y se midió la absorbancia a 382 nm antes de transcurridos 10 minutos. Los valores de concentración fueron obtenidos por interpolación en una curva estándar de ácido shikímico (Sigma-Aldrich, Buenos Aires, Argentina).

### **3.2.6 Análisis de la secuencia parcial de la 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato (EPSP) sintasa (EPSPS, EC 2.5.1.19)**

Tres plantas de *L. corniculatus* y *L. tenuis* fueron cultivadas en cámara de cultivo a  $21 \pm 1$  °C, con una intensidad lumínica de 100 µM<sup>-2</sup>seg<sup>-1</sup> y 16 h de fotoperiodo, regándose diariamente con solución Hoagland al medio. Cuando las plantas alcanzaron un nivel de desarrollo entre la 5ª y 7ª hoja fueron asperjadas con una solución de glifosato (Roundup Ultramax®, Monsanto) equivalente a una dosis de 1000 g ha<sup>-1</sup> con el fin de inducir la transcripción del ARNm de la EPSP sintasa. Las plantas fueron cosechadas 48 horas luego del tratamiento.

Para la extracción de ARN, las partes aéreas fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas inmediatamente a  $-70 \pm 1$  °C. Se pesaron entre 70 a 90 mg de tejido vegetal y luego se utilizó el kit comercial ZR Plant RNA MiniPrep (Zymo Research Corporation, Irvine, EE. UU.), para extraer el ARN total, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Una vez obtenido el ARN total, se realizó

una digestión con ADNasa I (Ambion, Austin, EE. UU.) para eliminar cualquier posible contaminación con ADN genómico. La síntesis de la primera hebra de cADN se llevó a cabo utilizando 2,5 µg de ARN total y la transcriptasa inversa Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV RT) (Invitrogen, Carlsbad, EE. UU.) en combinación con oligo (dT) de longitudes de entre 12 a 18 nucleótidos (Invitrogen, Carlsbad, EE. UU.) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Los primers específicos para amplificar la secuencia de ADNc de la EPSP sintasa, fueron diseñados en base a las secuencias disponibles de especies vegetales taxonómicamente cercanas, *Lotus japonicus* (número de acceso GenBank AP009741.1) y *Medicago truncatula* (número de acceso GenBank XM003605091.1). Se localizaron varias regiones conservadas a lo largo de las secuencias de nucleótidos, y a partir de ello se utilizó el programa Primer3 (Untergasser et al., 2012) para obtener así primers que presentaran porcentajes de GC adecuados y ausencia de autocomplementariedad. De todos los juegos de primers aceptables obtenidos, los indicados en la tabla 3.2 fueron los sintetizados. La elección se basó también en pruebas *in-silico* realizadas sobre otras secuencias de ADN de la enzima pertenecientes a otras leguminosas.

**Tabla 3.2.** Primers diseñados para el análisis de la secuencia parcial de la EPSP sintasa.

Par de primers	Secuencia (5' -> 3')	Producto esperado (pb)
1	ACGGCTATTCGGGTGTGTTT	(forward)
	TCCAAAGCGCTCCATCAACT	(reverse)
2	TTATTGGAAATTGTGATGTGGG	(forward)
	CTGCCATAAGCAAAGCAGTC	(reverse)
3	CCAGGTGAGCAGAATCCACA	(forward)
	GGGGAACCCCGTCAAGTATG	(reverse)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo en un volumen de reacción de 25 µL. La mezcla de reacción se preparó de la siguiente manera: 1 x buffer de PCR, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µM de cada primer, 0,2 mM de desoxinucleótidos, 1 unidad de ADN polimerasa Taq (Thermo Scientific, MA, EE. UU.) y 1,5 µL de ADNc. Las condiciones del ciclado fueron: 3 minutos a 94°C, 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 56°C y 30 segundos a 72°C, seguido del paso de extensión final de 10 minutos a 72°C. El producto de la reacción de PCR se verificó mediante electroforesis de gel de agarosa al 1,5%. Luego de confirmados el tamaño y calidad de los amplicones, el ADN fue enviado para su secuenciación (en ambos sentidos) al servicio de secuenciación de Macrogen. Las secuencias fueron ensambladas y analizadas utilizando el software MEGA version 5.2 (Tamura et al., 2011).

### **3.2.7 Análisis estadístico**

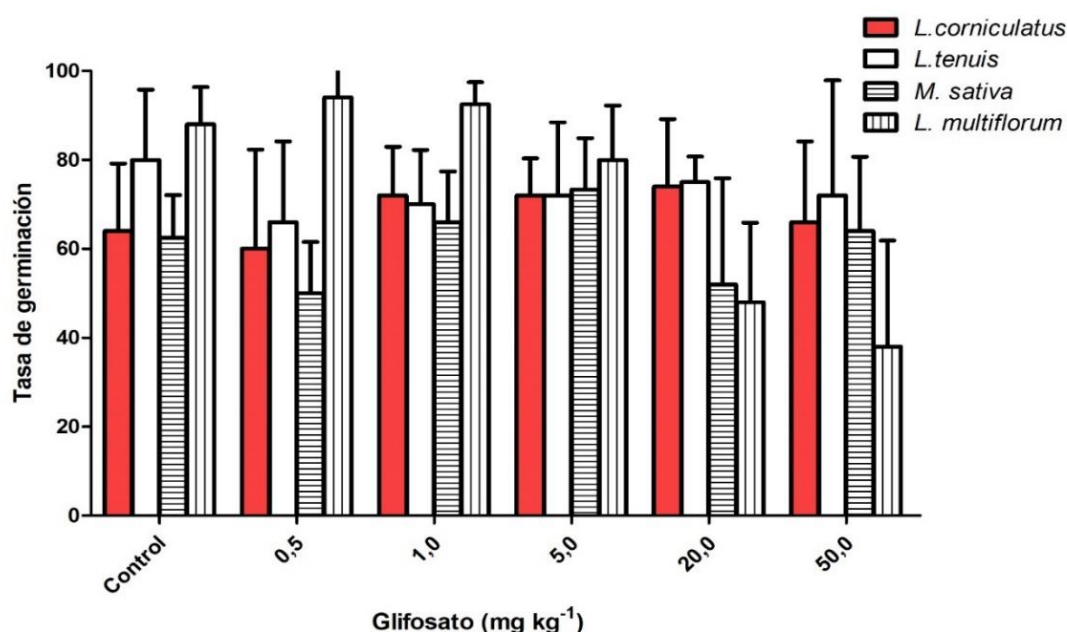
El análisis estadístico de todos los resultados fue realizado con el software GraphPad Prism Statistics v5.01. Se obtuvieron los parámetros de media y desvío estándar. La homogeneidad de varianzas fue probada para luego buscar diferencias significativas entre tratamientos a través de un test de ANOVA unidireccional. Las comparaciones post hoc fueron realizadas mediante el test de Dunnett con un intervalo de confianza de 95%.



### 3.3 Resultados y discusión

#### 3.3.1 Ensayo de tolerancia en agar

Luego de transcurrido el tiempo del ensayo, se observó que *L. multiflorum* presentó un descenso significativo en su tasa de germinación a partir de concentraciones de glifosato de 20,0 mg Kg<sup>-1</sup> ( $p < 0,001$ , con un intervalo de confianza del 95%) (Figura 3.5). Para el resto de las especies evaluadas, no existieron diferencias significativas. Algunos autores reportaron un descenso en la tasa de germinación en rangos de dosis que van desde los 10 a 160 mg L<sup>-1</sup> para especies vegetales de relevancia agronómica (Perez-Jones et al., 2007) y de 12,5 a 400 mg L<sup>-1</sup> (Perez & Kogan, 2003; Yanniccari et al., 2012a). Tanto las germinaciones a concentraciones de 20,0 y 50,0 mg L<sup>-1</sup> podrían ser indicativas de tolerancia, a priori. El análisis requiere incluir más variables de respuesta, que relacionen la germinación con el *endurance* de la especie.



**Figura 3.5.** Tasa de germinación de cada especie vegetal para las diferentes concentraciones de glifosato propuestas en el ensayo de tolerancia en agar.

En lo que a producción de biomasa respecta, se obtuvieron diferencias significativas en todas las especies de acuerdo con las diferentes concentraciones de glifosato propuestas (Tablas 3.3 y 3.4, y Figura 3.6). *M. sativa*, mostró la respuesta más sensible al glifosato, con un índice de tolerancia (Ti) de 0,55, seguido por el de *L. multiflorum*, de 0,92, ambas a la mínima concentración, 0,5 mg Kg<sup>-1</sup>. Por el

contrario, *L. tenuis* y *L. corniculatus* incrementaron su biomasa frente a la exposición a bajas dosis de glifosato, alcanzando un Ti de 1,53 y 1,11 a 1,0 mg Kg<sup>-1</sup> y 5,0 mg Kg<sup>-1</sup>, respectivamente. Este efecto paradójico es posiblemente atribuido al fenómeno de hormesis, que ha sido previamente reportado por otros autores que trabajaron con tolerancia al glifosato en plantas (Pline et al., 2002a; Petersen et al., 2007; Cedergreen & Olesen, 2010). Es así como *L. corniculatus* aumenta un 32% y *L. tenuis* un 53% de la biomasa total frente a concentración de glifosato de 1,0 mg Kg<sup>-1</sup> sin afectar de manera alguna su sobrevivencia ni su morfología (Figura 3.6).

**Tabla 3.3.** Resultados de ensayo de tolerancia a glifosato en agar para *L. corniculatus* y *L. tenuis*

Dosis de glifosato (mg kg <sup>-1</sup> )	<i>L. corniculatus</i>				<i>L. tenuis</i>			
	Biomasa (mg)	Indice de tolerancia (Ti)	Shikimato (μg g fresh wt <sup>-1</sup> )	Indice de exposición (Ei)	Biomasa (mg)	Indice de tolerancia (Ti)	Shikimato (μg g fresh wt <sup>-1</sup> )	Indice de exposición (Ei)
0.0	42 ± 17	1.00	60 ± 17	1.00	31 ± 15	1.00	70 ± 18	1.00
0.5	51 ± 22	1.18	61 ± 24	1.02	44 ± 23 *	1.39	101 ± 73	1.43
1.0	57 ± 33	1.32	87 ± 32	1.45	48 ± 25	1.53	153 ± 142	2.17
5.0	47 ± 23	1.11	278 ± 140	4.63	25 ± 11	0.80	627 ± 305	8.91
20.0	27 ± 11	0.63	678 ± 292 *	11.30	20 ± 7	0.64	2262 ± 1553 *	32.16
50.0	25 ± 8	0.58	1290 ± 447 *	21.50	14 ± 7 *	0.45	8357 ± 3924 *	118.82

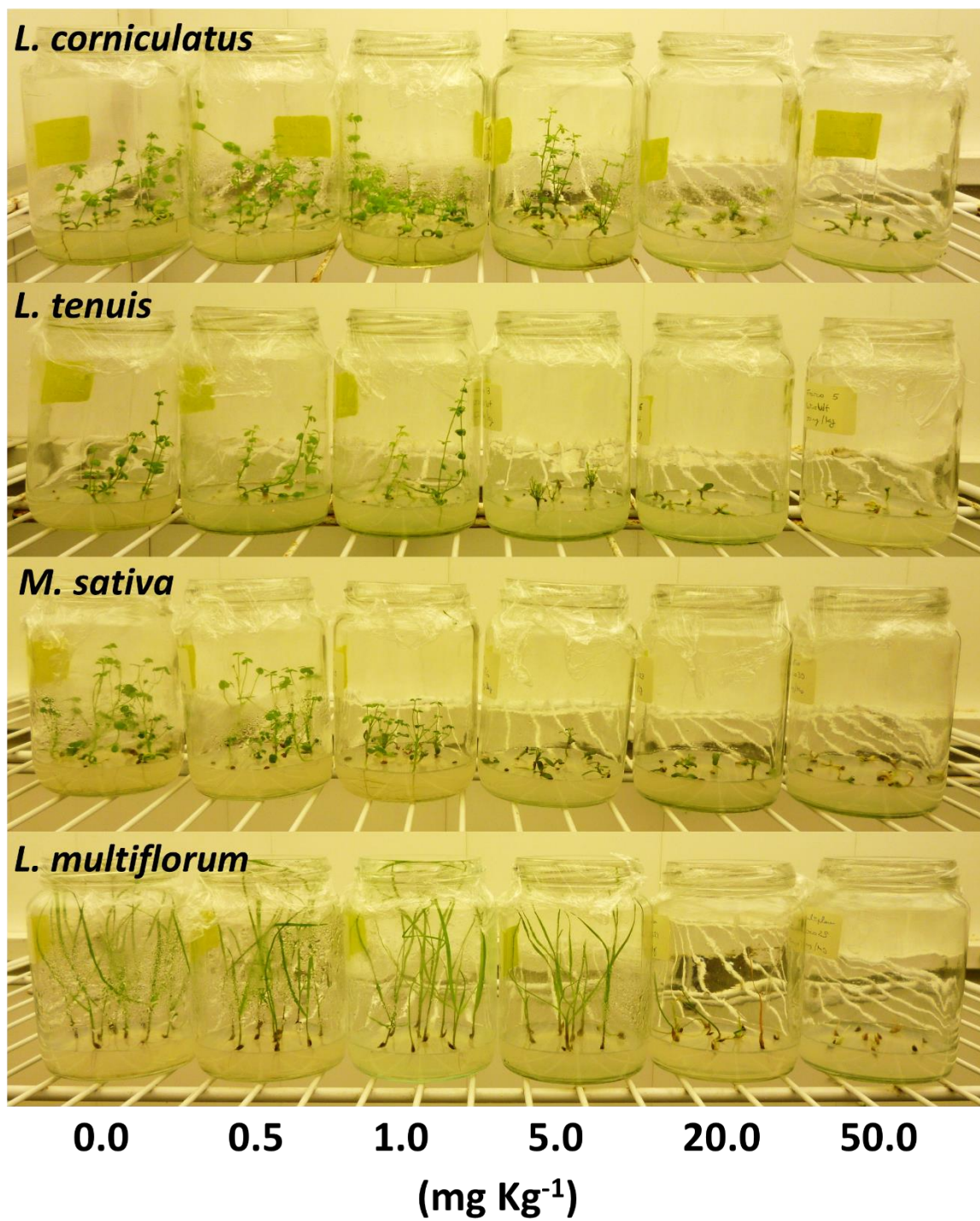
\*Indica diferencias significativas respecto al control con un nivel de significancia α = 0,05 mediante test *post-hoc* de Dunnett

**Tabla 3.4.** Resultados de ensayo de tolerancia a glifosato en agar para *M. sativa* y *L. multiflorum*

Dosis de glifosato (mg kg <sup>-1</sup> )	<i>M. sativa</i>				<i>L. multiflorum</i>			
	Biomasa (mg)	Indice de tolerancia (Ti)	Shikimato (μg g fresh wt <sup>-1</sup> )	Indice de exposición (Ei)	Biomasa (mg)	Indice de tolerancia (Ti)	Shikimato (μg g fresh wt <sup>-1</sup> )	Indice de exposición (Ei)
0.0	90 ± 58	1.00	41 ± 15	1.00	47 ± 19	1.00	61 ± 31	1.00
0.5	49 ± 38 *	0.55	66 ± 38	1.62	43 ± 13	0.92	86 ± 33	1.40
1.0	34 ± 23 *	0.38	101 ± 51	2.48	44 ± 15	0.92	48 ± 35	0.78
5.0	23 ± 10 *	0.26	531 ± 289	13.08	34 ± 11 *	0.71	490 ± 138	8.01
20.0	19 ± 6 *	0.21	996 ± 343 *	24.55	21 ± 5 *	0.43	1609 ± 607 *	26.32
50.0	22 ± 9 *	0.24	2117 ± 1369 *	52.16	13 ± 3 *	0.27	1294 ± 1431 *	21.17

\*Indica diferencias significativas respecto al control con un nivel de significancia α = 0,05 mediante test *post-hoc* de Dunnett

De los parámetros biométricos determinados durante el ensayo, la biomasa fue la que mostró la mejor correlación con las observaciones visuales y con la sobrevivencia para cada especie. *L. corniculatus* presentó cambios foliares mínimos (reducción del área foliar) a 5,0 mg Kg<sup>-1</sup> de glifosato, mientras que, a la misma concentración, las demás especies se mostraron visiblemente afectadas, presentando hojas cloróticas y desarrollo anormal de raíces. *L. tenuis* presentó además a esta concentración, un incremento en el número de meristemas, de igual manera que *L. corniculatus* a una concentración de 20,0 mg Kg<sup>-1</sup> (Figura 3.6). El límite de concentración de 5,0 mg Kg<sup>-1</sup> resulta crítico, ya que se corresponde con las máximas concentraciones determinadas en suelos bajo explotación agronómica, y por lo tanto es deseable que la especie vegetal propuesta tolere dicha concentración. Es importante destacar que el sistema experimental en el que se llevó a cabo el ensayo garantiza la máxima biodisponibilidad del herbicida, representando de esa forma, el peor escenario. Es posible suponer que, en suelos, los límites de tolerancia podrían ser incluso superiores.



**Figura 3.6.** Ensayo de tolerancia a glifosato de las especies vegetales candidatas en medio MS agarizado a los 28 días.

Todas las especies vegetales incrementaron su concentración de shikimato en tejido a medida que fueron expuestas a mayores concentraciones de glifosato. En esta tendencia, *L. corniculatus* exhibe el menor incremento inicial de dichas concentraciones. *M. sativa* y *L. tenuis* se mostraron como las especies vegetales con mayor incremento de índice de exposición (Ei), mientras que *L. multiflorum* se encuentra en una situación intermedia, mostrando valores bajos para algunos niveles de glifosato (llama la atención el Ei para 1,0 mg Kg<sup>-1</sup>) y altos, como el observado en el nivel de 5,0 mg Kg<sup>-1</sup> de glifosato.

En cuanto a la relación entre la acumulación de shikimato, la producción de biomasa y el aspecto visual, ésta es fuertemente dependiente de la especie. Por ejemplo, para el nivel de 1,0 mg Kg<sup>-1</sup>, un Ei de 2,48 en *M. sativa* se asoció a un descenso significativos de su biomasa y a daños visuales francos, mientras que en *L. tenuis*, con un Ei de 2,17 no produjo diferencias significativas en la biomasa respecto al control. Por otra parte, un Ei de 4,63 en *L. corniculatus* observado en el nivel de 5,0 mg Kg<sup>-1</sup> representó solamente un cambio en el área foliar de esa especie.

Una hipótesis para las diferencias observadas en las concentraciones de este marcador de exposición es que la menor concentración de shikimato observada en *L. corniculatus* podría estar asociada a una diferencia en la captación desde la raíz, hipótesis que podría ser corroborada en futuras experimentaciones utilizando glifosato marcado isotópicamente.

Teniendo en cuenta estas observaciones y considerando la respuesta particular brindada por cada especie ante una misma concentración de glifosato, se debe tener especial cuidado cuando la concentración de shikimato es utilizada como criterio en la evaluación del impacto del herbicida en futuros ensayos de fitorremediación. En este sentido, es indispensable conocer previamente los valores basales para cada especie vegetal, y la correlación que existe entre los valores de este marcador de exposición y el daño producido.

Los resultados observados en este ensayo sugieren que *L. corniculatus* es el mejor candidato de entre las especies evaluadas para ser implantada ya que tolera, por vía radicular, concentraciones superiores a los niveles máximos reportados de glifosato en suelos agrícolas. A su vez, la posibilidad de utilizar semillas comerciales en lugar de plántulas representa una ventaja agro-tecnológica significativa y reduce sustancialmente los costos de implementación. Otro aspecto interesante a considerar es el fenómeno de hormesis observado en esta especie cuando es expuesta a bajas concentraciones de glifosato, factor que puede contribuir a mejorar su sobrevivencia luego de la germinación, representando una posible ventaja adaptativa por mejorar en su competencia frente a otras especies presentes en el lote.

Las observaciones realizadas en este ensayo nos muestran que múltiples variables de respuesta deben ser tenidos en cuenta a la hora de realizar ensayos de tolerancia. Durante este ensayo, los resultados de la biomasa, la evaluación visual y la concentración de shikimato en el tejido vegetal fueron complementarios, permitiendo una interpretación mucho más completa del ensayo.

### 3.3.2 Ensayo de aplicación foliar

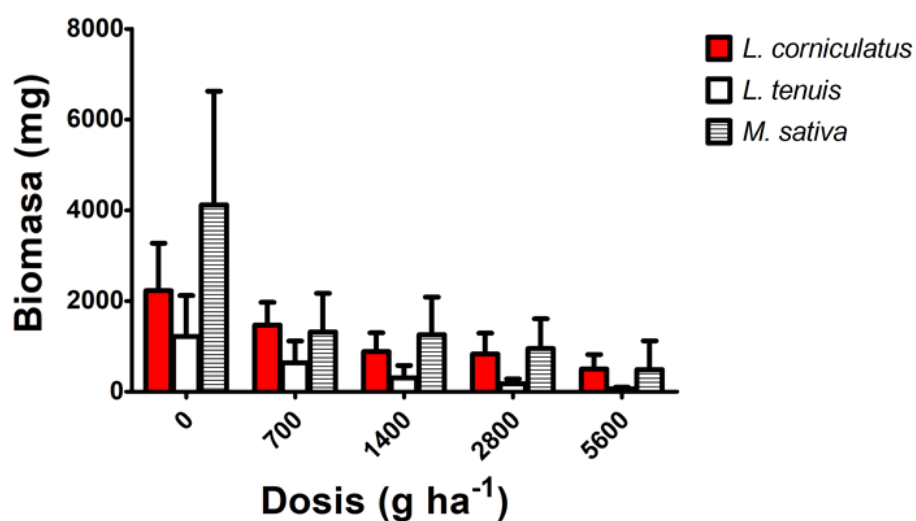
A partir de los resultados obtenidos en el ensayo de tolerancia en agar, se decidió determinar la respuesta a diferentes aplicaciones foliares de un formulado comercial de glifosato en las dos especies de *Lotus*. También fue incluida la alfalfa a modo de control, por haber presentado la mayor sensibilidad en todos los parámetros medidos.

Transcurridos los tiempos del ensayo, se observó que *L. corniculatus* y *L. tenuis* no mostraron diferencias significativas respecto al control en cuanto a su biomasa frente a una aplicación de 700 g ha<sup>-1</sup> de glifosato (tanto en el peso fresco como en el peso seco), mientras que las diferencias fueron significativas para los demás niveles. *M. sativa*, mostró diferencias significativas respecto al control para todas las dosis. Si bien adquirió la mayor biomasa de las tres especies evaluadas en el nivel control, una aplicación de glifosato por debajo de las recomendaciones del fabricante (700 g ha<sup>-1</sup>) redujo su peso total en un 68% en base a peso fresco (Figura 3.7A y 3.7B).

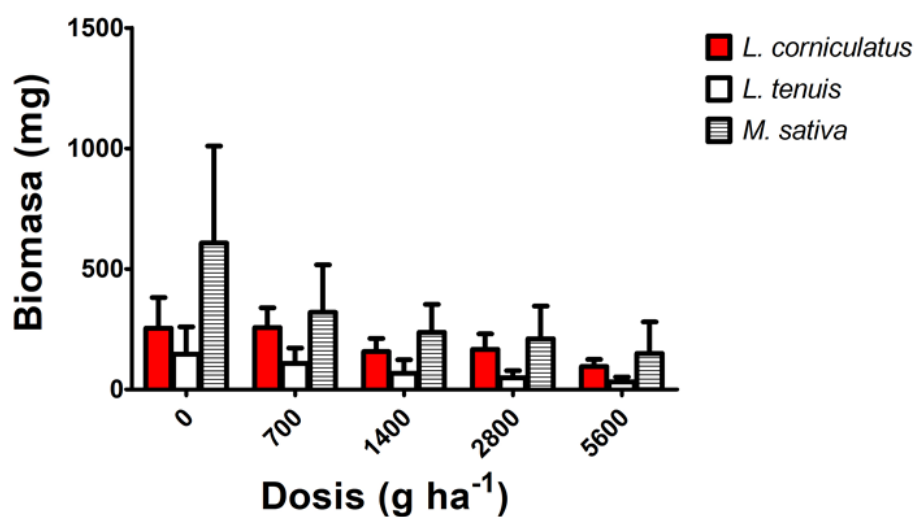
Con el fin de ampliar la interpretación del ensayo en términos de uso y manejo agronómico, las determinaciones de biomasa fueron validadas mediante *score* visual, en el cual cada individuo recibió un puntaje de daño de acuerdo con la tabla 3.1 de la sección 3.2.4. Los resultados se muestran en la tabla 3.5.

El *score* visual presenta una muy buena correlación con las diferencias entre las biomásas obtenidas para los diferentes niveles. En la aplicación de una dosis sub-agronómica, ambas especies de *Lotus* tampoco presentan daños superiores al punto de corte (15 puntos) por lo que indicaría que ambas especies son capaces de tolerar esa dosis, mientras que se ven controladas a dosis superiores. Se puede observar también, que *L. corniculatus* es la especie que mejor soporta todas las aplicaciones.

**A** Ensayo de aplicación foliar (peso fresco)



**B** Ensayo de aplicación foliar (peso seco)



**Figura 3.7.** Ensayo de aplicación foliar. A. Resultados de pesos frescos en las tres especies. B. Resultados de pesos secos en las tres especies.

**Tabla 3.5.** Score visual obtenido por cada especie vegetal evaluada en el ensayo de aplicación foliar

Nivel	Especie		
	<i>L. corniculatus</i>	<i>L. tenuis</i>	<i>M. sativa</i>
Control	0	0	0
700 $\text{g ha}^{-1}$	7	8	35
1400 $\text{g ha}^{-1}$	15	26	35
2800 $\text{g ha}^{-1}$	28	62	56
5600 $\text{g ha}^{-1}$	54	86	78

### 3.3.3 Determinación de ácido shikímico y contenido de clorofilas en planta entera

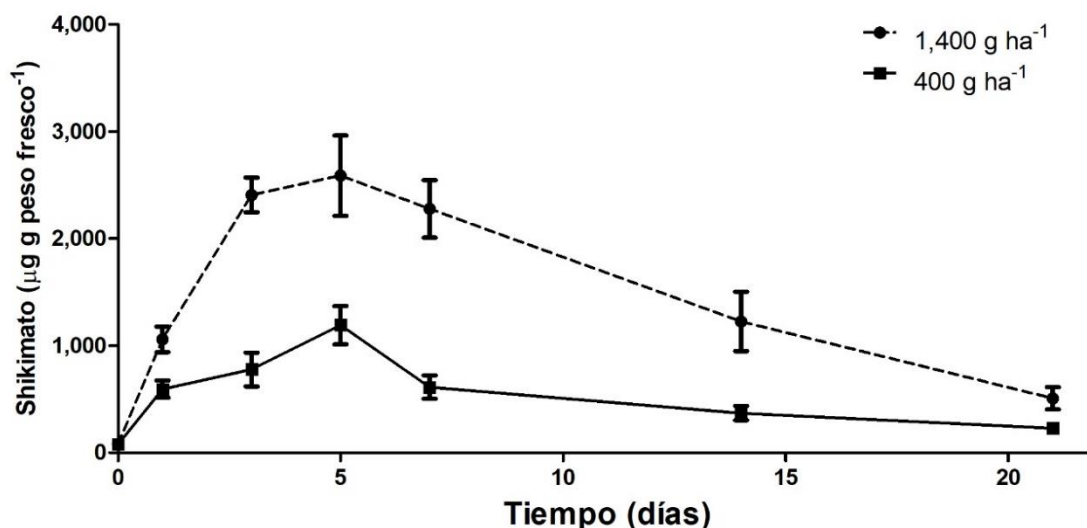
A partir de los resultados obtenidos luego de los dos ensayos de tolerancia, en donde *L. corniculatus*, se proyecta como la especie más adecuada para ser utilizada en un futuro ensayo de remediación, se decidió investigar la cinética de acumulación de shikimato en su tejido para entender el impacto temporal del glifosato en la especie.

También se acompañó este ensayo con la determinación de clorofilas totales, para de ese modo correlacionar la determinación de shikimato y el daño visual con un indicador bioquímico más general que diera cuentas del estado fisiológico general de la planta.

A plántulas de entre 5 y 7 hojas verdaderas, les fueron aplicadas por vía foliar dos dosis de glifosato, una de bajo impacto, de 400 g ha<sup>-1</sup> y otra de alto impacto, de 1.400 g ha<sup>-1</sup>. Luego, concentración de shikimato en planta entera y clorofila en hojas fueron medidas en función del tiempo (Ver la sección 3.2.5).

Luego de una aplicación de glifosato de 400 g ha<sup>-1</sup>, las plantas de *L. corniculatus* mostraron valores de concentración de shikimato similares a aquellos reportados en otras especies tolerantes (Dinelli et al., 2006; Perez-Jones et al., 2007) (Figura 3.8). Estos niveles de shikimato se corresponden con aquellas especies vegetales que poseen una tolerancia asociada a un déficit en la absorción y/o en la translocación del herbicida, que deviene en una reducción en la acumulación del herbicida en tejidos meristemáticos. Este mecanismo de tolerancia contribuiría a preservar también el tejido meristemático radicular luego de una aplicación, lo que aseguraría un alargamiento continuo de la raíz, manteniendo y distribuyendo en el suelo las bacterias degradadoras dentro del entorno rizosférico, si bien habría que profundizar con más ensayos para confirmarlo.

El máximo incremento en la concentración de shikimato se alcanzó entre el cuarto y séptimo día luego de la aplicación. A partir de ese día, se observó que los niveles de shikimato disminuyeron, sin volver a los niveles basales en el período del ensayo. Posiblemente esto se deba a que no se alcance el tiempo requerido para reestablecer el pool de EPSP sintasa. También se observó que el aumento de la concentración de shikimato anticipa la aparición de daños visuales, ya que los daños se observaron a partir del día 10 luego de la aplicación.



**Figura 3.8.** Acumulación de shikimato en tejido vegetal de *L. corniculatus* luego de aplicar una dosis subletal ( $400 \text{ g ha}^{-1}$ ) y una dosis letal ( $1.400 \text{ g ha}^{-1}$ )

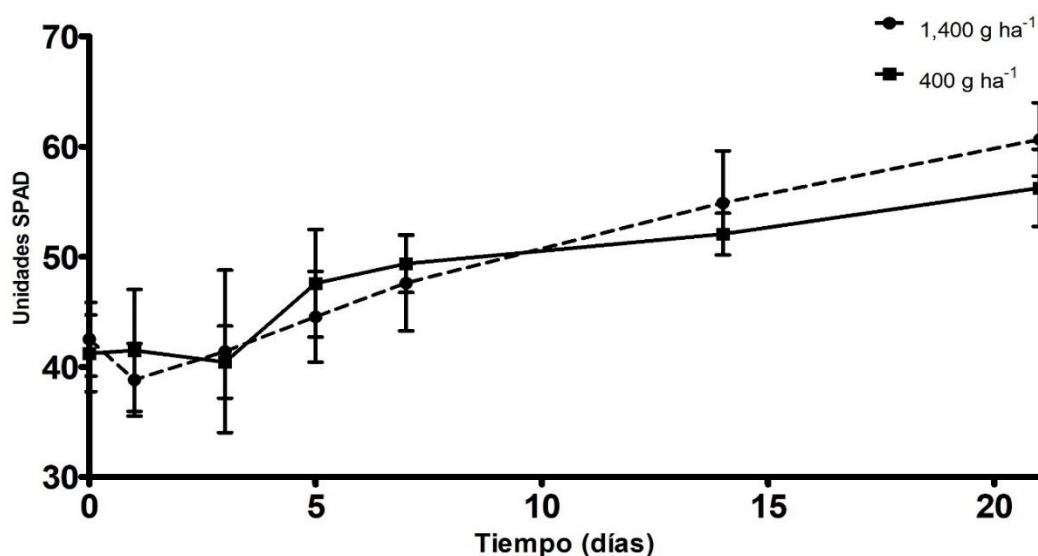
La aplicación de  $1.400 \text{ g ha}^{-1}$ , mostró un perfil similar al de la aplicación de  $400 \text{ g ha}^{-1}$ , aunque la cantidad de shikimato acumulada fue significativamente mayor para cada uno de los puntos determinados (Figura 3.8). Si bien los niveles de shikimato descendieron a partir del quinto día, como en la aplicación de  $400 \text{ g ha}^{-1}$ , no existió sobrevida de la planta en este caso. A partir de esta observación, podría asociarse tanto el punto máximo de acumulación de shikimato (al quinto día) o a la acumulación de shikimato (área bajo la curva), con un valor umbral del cual la especie vegetal no recupera el pool de EPSP sintasa y por ende esto resulta en su mortalidad.

Por ser una determinación espectrofotométrica y de bajo costo, la cuantificación de shikimato podría ser de gran utilidad en un futuro al monitorear exposición a glifosato en *L. corniculatus* durante ensayos de rizorremediación a campo.

En cuanto a la determinación de clorofilas totales, los resultados obtenidos mostraron una disminución de la cantidad al inicio del ensayo para verse luego incrementadas progresivamente hasta el final del ensayo. El comportamiento se repitió para las dos aplicaciones (Figura 3.9). La determinación de clorofila también resultó sensible a la aplicación de glifosato, si bien presentó un perfil diferente a los reportados en literatura, en donde la clorofila total en función del tiempo descende (Yanniccari et al., 2012b; Gao et al., 2014). En este caso, no se observaron diferencias significativas entre dosis para cada punto experimental.



Este perfil de concentraciones de clorofila es posiblemente causado por un estrés inicial asociado a la aplicación, seguido por los efectos específicos en el tejido meristemático, en donde la inhibición en el desarrollo de nuevas hojas induciría a una acumulación de clorofila en las hojas localizadas en la parte inferior de la planta. La re-movilización de nutrientes desde las partes inferiores a las partes superiores es un proceso común en el desarrollo de la planta, posiblemente interrumpido en este caso por la acción del glifosato en el tejido meristemático (Avice et al., 1996).



**Figura 3.9.** Perfil de clorofilas totales (unidades SPAD) en *L. corniculatus* frente a diferentes dosis de glifosato.

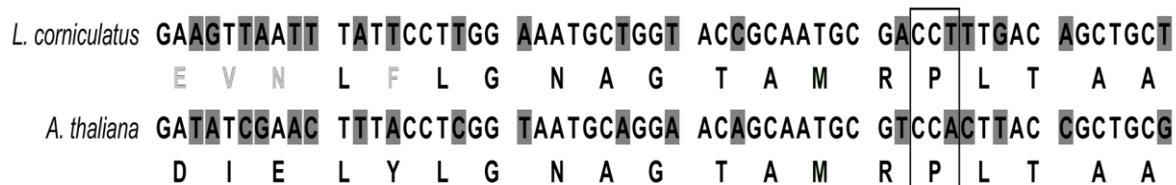
### 3.3.4 Análisis de la secuencia parcial de la 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato (EPSP) sintasa (EPSPS, EC 2.5.1.19)

El mecanismo de tolerancia al glifosato más frecuentemente reportado en malezas es la presencia de un polimorfismo de un solo nucleótido en el codón que codifica para el aminoácido que se encuentra en la posición 106 de la enzima enolpiruvil-shikimato-3-fosfatasa sintasa (EPSP sintasa), resultando en una sustitución de Prolina por Serina, Alanina o Treonina (Christoffers & Varanasi, 2010). La sustitución en esta posición modifica la orientación espacial de otros dos aminoácidos cercanos que se encuentran en el sitio de unión a glifosato. El cambio conformacional provocado por esta sustitución produce una disminución en la afinidad por el glifosato en la enzima, resultando en una especie vegetal resistente (Healy-Fried et al., 2007a).

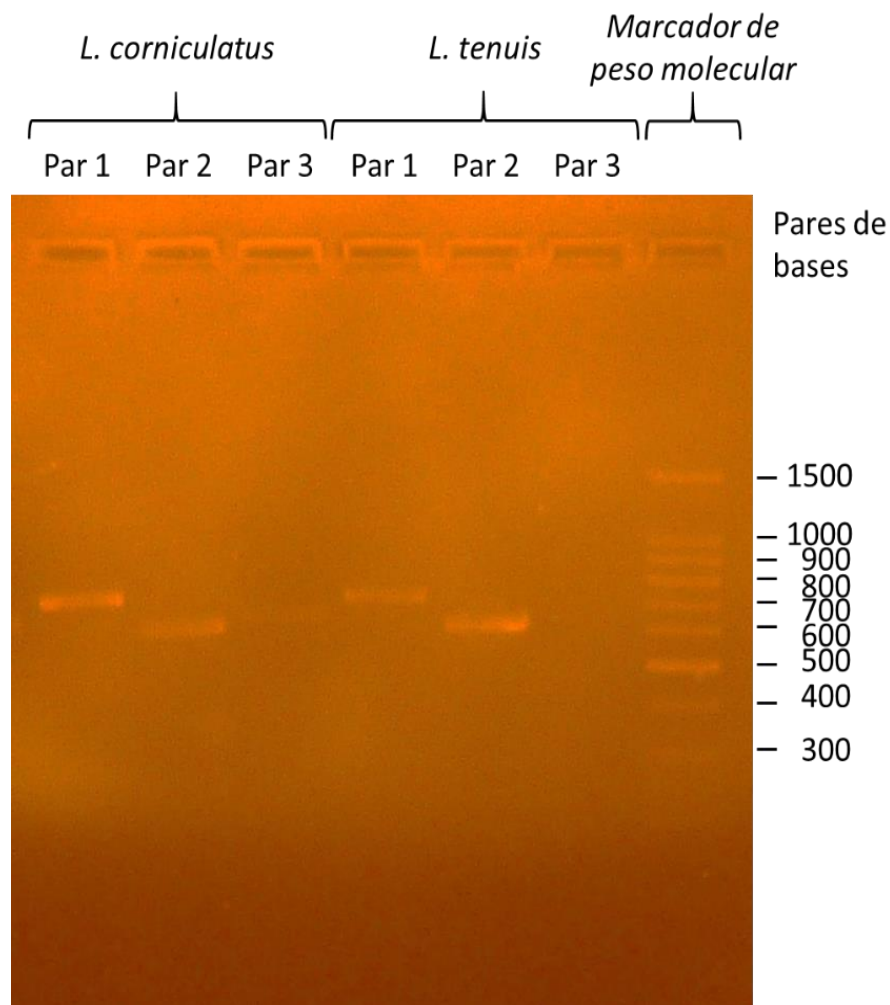
A partir del diseño de primers realizado, fue posible obtener la secuencia parcial de ADNc de *L. corniculatus*, la cual fue depositada en GenBank bajo el número de acceso KM076642.4. Debido a que los tres juegos de primers dieron como resultado un amplicón único del peso molecular estimado (Tabla 3.2), se optó por secuenciar el primero de éstos, por ofrecer el producto de mayor extensión y a su vez un mayor rendimiento (Figura 3.11). Luego de secuenciado el ADNc en ambos sentidos, y editada la información brindada a partir de los electroferogramas, se obtuvo la secuencia consenso que fue utilizada en el análisis.

Los resultados muestran una secuencia única que corresponde con la del gen que codifica la enzima EPSP sintasa. No se encontró la sustitución reportada en la posición 106 de la enzima (Figura 3.10), lo que indicaría que el nivel de tolerancia a glifosato observado en este cultivar no se debe a la mutación clásicamente reportada. Sin embargo, sería de interés en un futuro determinar también la actividad enzimática de la enzima, ya que en microorganismos han sido reportados recientemente un mayor número mutaciones en otros sitios de la enzima, otorgándoles resistencia al herbicida (Yi et al., 2016).

Estos resultados son consistentes con los observados en la acumulación de shikimate inducida por la aplicación foliar del herbicida, sugiriendo que los mecanismos de tolerancia están efectivamente relacionados con una captación o translocación diferencial de éste por la planta.



**Figura 3.10.** Alineación parcial del ADNc de la EPSP sintasa y la secuencia de aminoácidos inferida de *L. corniculatus* y *A. thaliana*. El codón enmarcado corresponde a la de posición de aminoácido 106, basado en la secuencia de *A. thaliana*.



**Figura 3.11.** Electroforesis en gel de agarosa en la que pueden observarse los productos de PCR obtenidos a partir de la secuencia de ADNc de la EPSP sintasa en *L. corniculatus* y *L. tenuis*. En este caso, se realizó también la amplificación en *L. tenuis* para verificar la versatilidad inter-especie de los primers. Se puede ver que el par de primers 1 y 2 funcionan en ambas especies, mientras que el 3 parecería no amplificar en *L. tenuis*.

### 3.4 Conclusiones

A partir de los ensayos realizados, se logró seleccionar a *L. corniculatus* como la especie tolerante candidata para desarrollar una posible estrategia de rizorremediación. En este sentido, *L. corniculatus* es capaz de tolerar 5 mg Kg<sup>-1</sup> de glifosato en medio semisólido agarizado de máxima biodisponibilidad (lo que posiblemente implique tolerar concentraciones mayores en matrices complejas como el suelo) y una aplicación foliar de producto comercial de 700 g ha<sup>-1</sup>. Esto se suma a sus muy buenas propiedades agronómicas, que implican no solo un excelente valor nutricional para la cría bovina, sino también su contribución al mejoramiento de la calidad del suelo, y su versatilidad respecto a la locación dentro del lote productivo.

Esto nos permite pensar a esta especie vegetal como herramienta de remediación en locaciones específicas dentro del sistema agro-productivo, ya sea como barrera entre el cultivo y el bajo (Figura 3.1), por donde escurre el producto luego de ser aplicado, o incluso en intersembra durante momentos específicos del ciclo del cultivo.

En su rol de barrera, debido a su adaptabilidad a la media loma y bajo dulce podría desarrollar un papel fundamental, deteniendo el movimiento de aguas provenientes de la loma que arrastran el agroquímico a los distintos cuerpos de agua. Ambientalmente, este representaría el riesgo mayor de contaminación, de acuerdo a lo expuesto en la sección 1.2.3.

En cambio, de aplicarse la semilla luego o durante un barbecho químico, podría aprovecharse la capacidad de germinar en dosis altas de herbicida, dándole una ventaja ecológica sobre otras especies, lo que no solo favorecería la degradación del herbicida, sino también controlando la aparición de nuevas malezas tolerantes, que constituye un serio problema en la región (Vila-Aiub et al., 2008; Shaner, 2014).

Es importante mencionar también que la implementación de la determinación de shikimato y el protocolo de score visual no sólo fueron pensadas como variables de respuesta para los ensayos *in-vitro* y en invernadero, sino que también deben ser consideradas para un futuro uso en ensayos a campo al momento de evaluación del impacto producido por el glifosato en *L. corniculatus*, por su simplicidad, costos y poder informativo.

Por último, el trabajo realizado en este capítulo contribuye a aumentar la plataforma de protocolos para evaluación de tolerancia a herbicidas en especies vegetales que posee el grupo,

habiéndose llevado a cabo laboriosos ensayos de aplicación foliar, fundamentales y omnipresentes en este tipo de trabajos.

### 3.5 Referencias

- Aparicio, V. C., De Gerónimo, E., Marino, D., Primost, J., Carriquiriborde, P., and Costa, J. L. (2013). Environmental fate of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins. *Chemosphere* 93, 1866–73. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.06.041.
- ASA, C. and S. (2004). *Alfalfa Management Guide: Harvest*.
- Avise, J. C., Ourry, A., Lemaire, G., and Boucaud, J. (1996). Nitrogen and Carbon Flows Estimated by <sup>15</sup>N and <sup>13</sup>C Pulse-Chase Labeling during Regrowth of Alfalfa. *Plant Physiol.* 112, 281–290. doi:10.1104/pp.112.1.281.
- Beuselinck, P. R. (1999). *Trefoil: The Science and technology of Lotus*. First edit. , eds. J. . Hatfield and J. . Volenec Madison, WI.
- Boerboom, C. M., Ehlke, N. J., Wyse, D. L., and Somers, D. A. (1991). Recurrent Selection for Glyphosate Tolerance in Birdsfoot Trefoil. *Crop Sci.* 31, 1124–1129. doi:10.2135/cropsci1991.0011183X003100050007x.
- Bouton, J. H. (2012). An overview of the role of lucerne (*Medicago sativa* L.) in pastoral agriculture. *Crop Pasture Sci.* 63, 734. doi:10.1071/CP12127.
- Cambareri, G. S., Castaño, J., Fernández, O. N., Maceira, N. ., and Vignolio, O. R. (2012). Lotus tenuis: un recurso forrajero estratégico para la ganadería de la Pampa Deprimida. 48.
- Carter, G. A., and Knapp, A. K. (2001). Leaf optical properties in higher plants: linking spectral characteristics to stress and chlorophyll concentration. *Am. J. Bot.* 88, 677–84. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11302854>.
- Cedergreen, N., and Olesen, C. F. (2010). Can glyphosate stimulate photosynthesis? *Pestic. Biochem. Physiol.* 96, 140–148. doi:10.1016/j.pestbp.2009.11.002.
- Christoffers, M. J., and Varanasi, A. V. (2010). “Glyphosate Resistance: Genetic Basis in Weeds,” in *Glyphosate Resistance in crops and weeds*, ed. V. K. Nandula (Hoboken, New Jersey: Wiley & Sons, Inc.).
- Cuadrado, V. (2009). Estudios de rizorremediación de suelos contaminados con herbicidas organoclorados.
- Dinelli, G., Marotti, I., Bonetti, a, Minelli, M., Catizone, P., and Barnes, J. (2006). Physiological and

- molecular insight on the mechanisms of resistance to glyphosate in *Conyza canadensis* (L.) Cronq. biotypes. *Pestic. Biochem. Physiol.* 86, 30–41. doi:10.1016/j.pestbp.2006.01.004.
- Dun, B. Q., Wang, X. J., Lu, W., Zhao, Z. L., Hou, S. N., Zhang, B. M., et al. (2007). Reconstitution of glyphosate resistance from a split 5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase gene in *Escherichia coli* and transgenic tobacco. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 7997–8000. doi:10.1128/AEM.00956-07.
- Environmental Protection Agency (2000). Introduction to Phytoremediation. *U.S. Environ. Prot. Agency*, 1–72. doi:EPA/600/R-99/107.
- EPPO Phytotoxicity assessment (2011). 135.
- Escaray, F. J., Menendez, A. B., Gárriz, A., Pieckenstein, F. L., Estrella, M. J., Castagno, L. N., et al. (2011). Ecological and agronomic importance of the plant genus *Lotus*. Its application in grassland sustainability and the amelioration of constrained and contaminated soils. *Plant Sci.* doi:10.1016/j.plantsci.2011.03.016.
- Gaines, T. a, Zhang, W., Wang, D., Bukun, B., Chisholm, S. T., Shaner, D. L., et al. (2010). Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 1029–34. doi:10.1073/pnas.0906649107.
- Gao, Y., Tao, B., Qiu, L., Jin, L., and Wu, J. (2014). Role of physiological mechanisms and EPSPS gene expression in glyphosate resistance in wild soybeans (*Glycine soja*). *Pestic. Biochem. Physiol.* 109, 6–11. doi:10.1016/j.pestbp.2013.12.005.
- Guillet, M. (1984). *Las gramíneas forrajeras*. First Edit. Zaragoza, España: Editorial Acribia.
- Hagen, N. (2012). Efecto de la fertilización de Rye Grass (*Lolium multiflorum*). 24.
- Hannaway, D., Frasen, S., Cropper, J., Teel, M., Chaney, M., Griggs, T., et al. (1999). Annual Ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.). 20.
- Healy-Fried, M. L., Funke, T., Priestman, M. A., Han, H., and Schönbrunn, E. (2007a). Structural basis of glyphosate tolerance resulting from mutations of Pro101 in *Escherichia coli* 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *J. Biol. Chem.* 282, 32949–32955. doi:10.1074/jbc.M705624200.
- Healy-Fried, M. L., Funke, T., Priestman, M. a, Han, H., and Schönbrunn, E. (2007b). Structural basis of glyphosate tolerance resulting from mutations of Pro101 in *Escherichia coli* 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *J. Biol. Chem.* 282, 32949–55.

doi:10.1074/jbc.M705624200.

Henry, W. B., Shaner, D. L., and West, M. S. (2007). Shikimate Accumulation in Sunflower , Wheat , and Proso Millet after Glyphosate Application. 1–5. doi:10.1614/WS-06-065.1.

Hoagland, D. R., and Arnon, D. I. (1950). *The water-culture method for growing plants without soil*. doi:citeulike-article-id:9455435.

Ing, A., Rafael, A., and Attellis, A. D. (2005). ALFALFA ( *Medicago sativa* L . ) Producción de semilla.

Maeda, H., and Dudareva, N. (2012). The shikimate pathway and aromatic amino Acid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63, 73–105. doi:10.1146/annurev-arplant-042811-105439.

Maxwell, K., and Johnson, G. N. (2000). Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51, 659–668. doi:10.1093/jxb/51.345.659.

Miñón, D. P., Sevilla, G. H., Montes, L., and Fernández, O. N. (1990). Lotus tenuis: Leguminosa Forrajera para la Pampa Deprimida. *Boletín técnico n° 98 Unidad Integr. Balcarce*, 16.

Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473–497. doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.

Perez-Jones, A., Park, K.-W., Polge, N., Colquhoun, J., and Mallory-Smith, C. a (2007). Investigating the mechanisms of glyphosate resistance in Lolium multiflorum. *Planta* 226, 395–404. doi:10.1007/s00425-007-0490-6.

Perez, a, and Kogan, M. (2003). Glyphosate-resistant Lolium multiflorum in Chilean orchards. *Weed Res.* 43, 12–19. doi:10.1046/j.1365-3180.2003.00311.x.

Peruzzo, P. J., Porta, A. a, and Ronco, A. E. (2008). Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environ. Pollut.* 156, 61–6. doi:10.1016/j.envpol.2008.01.015.

Petersen, I. L., Hansen, H. C. B., Ravn, H. W., Sørensen, J. C., and Sørensen, H. (2007). Metabolic effects in rapeseed (*Brassica napus* L.) seedlings after root exposure to glyphosate. *Pestic. Biochem. Physiol.* 89, 220–229. doi:10.1016/j.pestbp.2007.06.009.

Pline, W. A., Wilcut, J. W., Edmisten, K. L., and Wells, R. (2002a). Physiological and morphological response of cotton seedlings to root-absorbed glyphosate. 73, 48–58.

Pline, W. a, Wilcut, J. W., Duke, S. O., Edmisten, K. L., and Wells, R. (2002b). Tolerance and accumulation of shikimic acid in response to glyphosate applications in glyphosate-resistant and



- nonglyphosate-resistant cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *J. Agric. Food Chem.* 50, 506–12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11804521>.
- Sammons, R. D., and Gaines, T. A. (2014). Glyphosate resistance: State of knowledge. *Pest Manag. Sci.* 70, 1367–1377. doi:10.1002/ps.3743.
- Schmid, J., and Amrhein, N. (1995). REVIEW ARTICLE NUMBER 104 MOLECULAR ORGANIZATION OF THE SHIKIMATE PATHWAY IN HIGHER PLANTS. 39, 737–749.
- Scribner, E. a., Battaglin, W. a., Gilliom, R. J., and Meyer, M. T. (2007). Concentrations of Glyphosate, Its Degradation Product, Aminomethylphosphonic Acid, and Glufosinate in Ground- and Surface-Water, Rainfall, and Soil Samples Collected in the United States, 2001–06. *U.S. Geol. Surv. Investig. Rep. 2007-5122*, 111.
- Shaner, D. L. (2010). “Testing Methods for Glyphosate resistance,” in *Glyphosate Resistance in crops and weeds*, ed. V. K. Nandula (Hoboken, New Jersey: Wiley & Sons, Inc.).
- Shaner, D. L. (2014). Lessons Learned From the History of Herbicide Resistance. *Weed Sci.* 62, 427–431. doi:10.1614/WS-D-13-00109.1.
- Shaner, D. L., Nadler-Hassar, T., Henry, W. B., and Koger, C. H. (2005). A rapid in vivo shikimate accumulation assay with excised leaf discs. *Weed Sci.* 53, 769–774. doi:10.1614/WS-05-009R.1.
- Singh, A., Eapen, S., and Fulekar, M. H. (2009). Potential of *Medicago sativa* for uptake of cadmium from contaminated environment. *Rom. Biotechnol. Lett.* 14, 4164–4169.
- Singh, B. K., and Shaner, D. L. (1998). Rapid determination of glyphosate injury to plants and identification of glyphosate-resistant plants. *Weed Technol.* 12, 527–530. Available at: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0031721950&partnerID=40&md5=dc995385f7c642f5b041b9bc2af2f480>.
- Society, W. S., and Science, W. (1990). Mechanism of Glyphosate Tolerance in Birdsfoot Trefoil ( *Lotus corniculatus* ) Author ( s ): Chris M . Boerboom , Donald L . Wyse and David A . Somers Published by : Weed Science Society of America Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/4045056> REFERENCE. 38, 463–467.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731–2739. doi:10.1093/molbev/msr121.
- Tong, X. H., Daud, M. K., Sun, Y. Q., and Zhu, S. J. (2009). Physiological and molecular mechanisms of

- glyphosate tolerance in an in vitro selected cotton mutant. *Pestic. Biochem. Physiol.* 94, 100–106. doi:10.1016/j.pestbp.2009.04.007.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., et al. (2012). Primer3- new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 40, 1–12. doi:10.1093/nar/gks596.
- Veiga, F., Zapata, J. M., Fernandez Marcos, M. L., and Alvarez, E. (2001). Dynamics of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in a forest soil in Galicia, north-west Spain. *Sci. Total Environ.* 271, 135–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11346036>.
- Vila-Aiub, M. M., Balbi, M. C., Distéfano, A. J., Fernández, L., Hopp, E., Yu, Q., et al. (2011). Glyphosate resistance in perennial Sorghum halepense (Johnsongrass), endowed by reduced glyphosate translocation and leaf uptake. *Pest Manag. Sci.* doi:10.1002/ps.2286.
- Vila-Aiub, M. M., Vidal, R. A., Balbi, M. C., Gundel, P. E., Trucco, F., and Ghersa, C. M. (2008). Glyphosate-resistant weeds of South American cropping systems: an overview. *Pest Manag. Sci.* 64, 366–371. doi:10.1002/ps.1488.
- Yanniccari, M., Istilart, C., Giménez, D. O., and Castro, A. M. (2012a). Glyphosate resistance in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) from Argentina. *Crop Prot.* 32, 12–16. doi:10.1016/j.cropro.2011.09.021.
- Yanniccari, M., Tambussi, E., Istilart, C., and Castro, A. M. (2012b). Glyphosate effects on gas exchange and chlorophyll fluorescence responses of two *Lolium perenne* L. biotypes with differential herbicide sensitivity. *Plant Physiol. Biochem.* 57, 210–7. doi:10.1016/j.plaphy.2012.05.027.
- Yi, S., Cui, Y., Zhao, Y., Liu, Z., Lin, Y., and Zhou, F. (2016). A Novel Naturally Occurring Class I 5-Enolpyruvylshikimate-3-Phosphate Synthase from *Janibacter* sp. Confers High Glyphosate Tolerance to Rice. *Sci. Rep.* 6, 19104. doi:10.1038/srep19104.

### S3.1 Material suplementario

#### S.3.1.1 Medio Murashige-Skoog (MS)

Compuesto	Cantidad (g L <sup>-1</sup> )
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,650
KNO <sub>3</sub>	1,900
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,440
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,170
Na <sub>2</sub> -EDTA	0,0373
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,0278
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2 mg
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22,3 mg
ZnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	8,6 mg
KI	0,83 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,036 mg
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025 mg
CoCl <sub>2</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025 mg
Sacarosa	30,0
Glicina	2,0 mg
Ácido Indolacético	15,0 mg
<i>myo</i> -Inositol	100,0 mg
Piridoxina.HCl	0,5 mg
Tiamina.HCL	0,1 mg
Ácido nicotínico	0,5 mg
Agar de grado “tejido vegetal”	10,0
pH: 5,7-5,8	

#### Referencia bibliográfica

Murashige T, Skoog F (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473–497. doi:10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.

### S.3.1.2 Solución Hoagland

Compuesto	Cantidad (g L <sup>-1</sup> )
KNO <sub>3</sub>	101,1
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	236,16
(NH <sub>4</sub> ) H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	114,93
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	246,25
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1,78
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,84
Zn SO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,05
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,08
MoO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,025
FeNa EDTA	37,0
pH: 6,5-7,5	

#### Referencia bibliográfica

Hoagland DR, Arnon DI (1950). The water-culture method for growing plants without soil. doi:citeulike-article-id:9455435.

### S3.1.3 Protocolo para determinar ácido shikímico en tejido vegetal

#### Toma de muestra

- 1- Tomar una cantidad de tejido vegetal superior a 50 mg.
- 2- Pesar la muestra y registrar el peso ( $\pm 1$  mg).

#### Extracción

- 1- Introducir el tejido vegetal en un microtubo de 1,5 mL y tapar el tubo.
- 2- Introducir el tubo en  $N_2$  líquido.
- 3- Homogeneizar la muestra mediante uso de pistilo para microtubo por no menos de 30 segundos.
- 4- Agregar al tubo 1,0 mL de HCl 0,25 N.
- 5- Vortexear por 10 minutos.
- 6- Congelar a  $-20^\circ C$ .
- 7- Descongelar y reservar a temperatura ambiente por un tiempo mayor a 30 minutos.

#### Cuantificación

- 1- Centrifugar a 25,000 g por 15 minutos.
- 2- Tomar una alícuota de 250  $\mu L$  de sobrenadante y depositarla en un microtubo de 1,5 mL.
- 3- Agregar al tubo 250  $\mu L$  de una solución  $HIO_4$  0,25%  $NaIO_4$  0,25% .
- 4- Incubar a  $37^\circ C$  durante 30 minutos.
- 5- Agregar 500  $\mu L$  de NaOH 0,6 N  $Na_2SO_3$  0,22 M.
- 6- Medir en espectrofotómetro a 382 nm.
- 7- Interpolare el resultado en la curva de calibración e informar la concentración de ácido shikímico.

#### Curva de calibración

- 1- Fabricar soluciones de standard de ácido shikímico 0, 4, 8, 12, 20 y 28  $\mu M$ .
- 2- Tomar 250  $\mu L$  de cada concentración depositarla en un microtubo de 1,5 mL.
- 3- Fabricar no menos de 3 replicados por concentración.
- 4- Agregar al tubo 250  $\mu L$  de una solución  $HIO_4$  0,25%  $NaIO_4$  0,25%.
- 5- Incubar a  $37^\circ C$  durante 30 minutos.
- 6- Agregar 500  $\mu L$  de NaOH 0,6 N  $Na_2SO_3$  0,22 M.
- 7- Medir en espectrofotómetro a 382 nm.
- 8- Fabricar una curva de calibración de absorbancia en función de la concentración.

#### Referencia bibliográfica

Shaner, D. L., Nadler-Hassar, T., Henry, W. B., and Koger, C. H. (2005). A rapid in vivo shikimate accumulation assay with excised leaf discs. *Weed Sci.* 53, 769–774. doi:10.1614/WS-05-009R.1.

---

**Capítulo 4 - Estudios en suelos  
crónicamente expuestos a glifosato:  
Caracterización fisicoquímica y  
microbiológica, y aislamiento de  
microorganismos tolerantes para  
llevar a cabo procesos de  
rizorremediación**

---

## 4.1 Introducción

Una vez definida la especie vegetal tolerante que se utilizará para el diseño de la herramienta de rizorremediación, resta entonces definir la forma en que se complementará la degradación del xenobiótico por parte de los microorganismos. Como se expuso en capítulos anteriores, no existen mecanismos de degradación del glifosato relevantes reportados en especies vegetales (Sammons and Gaines, 2014). A su vez, el glifosato presenta un valor negativo de  $\log K_{ow}$ , lo que hace que el transporte desde suelo hasta los tejidos metabólicamente activos en la raíz sea minoritario. Por eso, se plantea una estrategia de rizorremediación donde la especie vegetal es la responsable de generar una dinámica hídrica superficial favorable y asegurar la viabilidad de los microorganismos en el suelo, quienes serán los verdaderos responsables de llevar a cabo la degradación del glifosato. Existen entonces, para cualquier método de fitorremediación asistida por microorganismos (Gerhardt et al., 2009), distintas aproximaciones para asegurar la presencia en un número considerablemente alto de microorganismos degradadores en el entorno rizosférico, que podrían clasificarse como: *Bioaumentación*, *Bioestimulación* y *Selección dirigida por la especie vegetal* (Thijs & Vangronsveld, 2015).

El *Bioaumentación* consiste en la inoculación de las raíces de la especie vegetal con microorganismos (ya sea de forma aislada o en consorcios) cuya eficiencia metabólica respecto al xenobiótico está debidamente caracterizada. Un sinnúmero de microorganismos con distintas capacidades de degradación y/o tolerancia a una amplia gama de contaminantes han sido aislados de los más diversos ambientes. Sin embargo, se han realizado intentos de aplicar directamente microorganismos degradadores en suelos contaminados, los cuales han sido infructuosos en su mayoría o presentado resultados controvertidos, por depender de diversas variables su éxito (Thompson et al., 2005; Tyagi et al., 2011).

En este sentido, la inoculación de especies vegetales con cepas o consorcios reivindica la utilización de microorganismos aislados en laboratorio con capacidad degradadora, puesto que pretende hacer valer la intrincada relación que existe entre planta y bacteria. Es así como se busca una asociación planta-microorganismo que resulte benéfica tanto para la planta como para el microorganismo. Ciertos microorganismos poseen una o varias capacidades de promoción de crecimiento vegetal, que son mecanismos celulares destinados a favorecer positivamente cambios en la estructura y extensión radicular, acceso a nutrientes y defensa contra distintos patógenos, entre otros. La asociación con este tipo de microorganismos por parte de la planta le confiere ventajas adaptativas respecto al resto de especies vegetales presentes en el terreno (Figueiredo et al., 2010). Por otro lado, las raíces de las

plantas liberan, en su entorno rizosférico, una gran cantidad de fotosintatos, a través del fenómeno llamado rizodeposición. En estas deposiciones se liberan en forma de exudados, secreciones, mucilagos y lisados celulares, una amplia cantidad de compuestos orgánicos como ácidos orgánicos, hidratos de carbono y aminoácidos, que estimulan fuertemente el crecimiento de microorganismos en las zonas cercanas a la raíz. Como se mencionó en el capítulo 1, este estímulo, que se refleja en un recuento de microorganismos varios órdenes de magnitud superior al del suelo desprovisto de raíces, es llamado “efecto rizosférico”. La posibilidad por parte del microorganismo de establecerse en la zona de influencia de la raíz asegurará entonces acceso a distintas fuentes nutricionales. Existe numerosos trabajos en donde se presentan las interacciones específicas entre microorganismos (entre ellos bacterias y hongos) y distintas especies vegetales orientados a procesos de rizadorremediación (Vangronsveld et al., 2009; Gerhardt et al., 2017; Jambon et al., 2018).

La *Bioestimulación* consiste en estimular el metabolismo degradativo de las comunidades microbianas asociadas y cercanas a la rizosfera, a partir de la utilización de distintos enmiendas, como fertilizantes, ácidos carboxílicos, ciclodextrinas y otras sustancias que mimeticen los exudados radiculares, así como también productos que favorezcan la biodisponibilidad del contaminante, como detergentes o EDTA (Reichenauer & Germida, 2008). Como parte del proceso, es necesario asegurar que la comunidad microbiana que habita en la rizosfera posee la capacidad para degradar el contaminante. También es necesario saber cómo y cada cuánto tiempo realizar la bioestimulación. Al momento de introducir especies vegetales en suelos de baja fertilidad o sometidos a diversos tipos de estrés, como el salino, hídrico, o el producido por el propio contaminante, se pretende generar condiciones más favorables para asegurar una implantación exitosa. En ese sentido, la enmienda agregada generalmente contribuye también a potenciar distintas capacidades de promoción de crecimiento vegetal.

La *Selección dirigida por la especie vegetal*, si bien merece ser mencionada, se encuentra en fases de desarrollo temprano, ya que involucra organismos genéticamente modificados (Bell et al., 2014). Existe evidencia, tanto por técnicas dependientes como también independientes de cultivo, que la estructura y dinámica de las comunidades microbianas difieren en función de la especie vegetal en la que estén presente, y a su vez en función de la condición de estrés a la que estén sometidas (Ratcliff et al., 2006; Kremer & Means, 2009; Newman et al., 2016a). Por ejemplo, si frente a la aplicación de glifosato se induce el crecimiento o se estimula el metabolismo degradador de un determinado grupo de microorganismos, entonces sería razonable proponer la modificación genética de una determinada especie vegetal para que secreta un perfil característico de metabolitos que promueva la presencia de



comunidades microbianas degradadoras por sobre otras; o bien, produzca enzimas que puedan ser secretadas en exudados radiculares y metabolicen directamente al contaminante.

De todas las aproximaciones mencionadas, el bioaumentación resulta la estrategia más apropiada para nuestro contexto de aplicación, por lo que el objetivo principal de este capítulo será disponer de microorganismos puros que cuenten con un adecuado nivel de tolerancia a glifosato, que a su vez lo degraden, y que posean uno o varios rasgos benéficos en cuanto a la promoción de crecimiento vegetal. Todas estas características se evaluarán a lo largo del capítulo 5, centrando el foco de este capítulo en el procedimiento de aislamientos microbianos y en la caracterización de los distintos suelos y matrices de origen.

El aislamiento y re-inoculación con microorganismos puros tiene varias ventajas respecto a la bioestimulación. La bioestimulación depende de microorganismos nativos, por lo que cada suelo debe ser caracterizado en cuanto a su potencial degradador previo a su implementación. Esta caracterización, posible en terrenos de poca extensión, se hace imposible en los suelos que corresponden a la extensión de la Pampa Húmeda, que poseen distintas características edáficas (composición, estructura, textura), distintos climas y precipitaciones, así como distintas prácticas de laboreo. Además, de aplicarse cualquier tipo de enmienda, esta también debería optimizarse, y representaría un costo operativo y en insumos que el productor agrícola posiblemente no esté dispuesto a aceptar.

Por otro lado, sí es posible llegar a definir una combinación óptima planta-microorganismo que podría ser, *a priori*, aplicada a los diferentes ambientes que presenta el territorio pampeano, donde sea exitosa la implantación de la especie vegetal. La inoculación de semillas, además, es un proceso más económico que la enmienda nutricional.

Otro elemento de análisis a considerar es que el producto biotecnológico que se pretende desarrollar está formado por un sistema planta-microorganismo, ya que la planta *per se* no degrada glifosato. Entonces el producto, al ser comercializado debe necesariamente poseer esa característica, aspecto que la bioestimulación no asegura.

Durante esta etapa de trabajo se cumplió parcialmente el siguiente objetivo específico:

4. Aislar y caracterizar tanto fenotípica como genotípicamente bacterias tolerantes y degradadoras de glifosato, obtenidas a partir de terreno agrícola que se encuentra bajo uso intensivo de glifosato.

## 4.2 Materiales y métodos

### 4.2.1 Procedimiento de toma de muestra

Para realizar el procedimiento de aislamiento de microorganismos, recurrimos a la Chacra experimental Manantiales, dependencia del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), en Chascomús, provincia de Buenos Aires, Argentina (35°34'30"S 58°00'32"W) (Figura 4.1).



**Figura 4.1.** Imagen satelital de la Chacra Experimental Manantiales. Delimitados con líneas amarillas, se señalan los cuatro lotes donde se llevó a cabo la toma de muestra.

La estación experimental lleva adelante, desde hace más de una década, un proyecto referente a la promoción de *L. tenuis* en suelos del bajo del salado. Allí, dos lotes, denominados L1 y L3, son aplicados dos veces por año con una dosis muy alta de glifosato, de aproximadamente 3,5 L ha<sup>-1</sup>, con el objetivo de quitarle a *L. tenuis* la competencia de otras especies vegetales presentes. Para esto, es necesario que la planta logre un buen nivel de germinación y de cobertura, lo cual se estimula con la limpieza del lote durante el invierno, mediante la aplicación de glifosato. La predominancia de *L. tenuis* se logra controlando las demás especies vegetales, que tienen una velocidad de germinación mucho

mayor, y que, si no fuese por la presión ejercida por el proceso de promoción con herbicida, daría origen a una población mixta de pasturas (por ejemplo: Lotus, ryegrass y trébol blanco).

A lo largo de los años, se fue incrementando la proporción de *L. tenuis* por sobre las demás pasturas en el banco de semillas dentro de los lotes. Otros dos lotes, L2 y L4 corresponden a aquellos con pasturas llamadas “naturales”. En ellas, se dejó evolucionar el lote sin ningún tratamiento de promoción, por lo que presentan un perfil de especies vegetales diferenciado respecto a los lotes L1 y L3. Como se puede observar en la figura 4.1, los lotes L1 y L2 están próximos uno a otro, así como también los lotes L3 y L4. Esto ocurre porque L1 y L3 poseen características edáficas diferentes, por lo que se seleccionaron lotes control correspondientes (L2 y L4) con iguales propiedades, a excepción del tratamiento de promoción. Así, L1 tiene como control a L2, y L3 tiene como control a L4.

Los lotes L1 y L3, considerados como crónicamente expuestos a glifosato, se utilizarán para obtener microorganismos degradadores y tolerantes a partir de muestras de rizosfera y de suelo. Los lotes L2 y L4 se utilizarán alternativamente como control para los diferentes estudios de comunidades y recuentos de microorganismos cultivables.

Estos lotes ofrecen condiciones inmejorables para realizar el trabajo de aislamiento de microorganismos, ya que contamos con la especie vegetal muy cercana a aquella que caracterizamos como tolerante, que a su vez se encuentra implantada en suelos crónicamente expuestos a glifosato, el cual se aplica regularmente y a altas dosis. Esto podría indicar que los microorganismos allí aislados se encuentran bajo un doble proceso de selección, uno por parte de la rizosfera de *L. tenuis* y el otro por parte de la presencia de glifosato.

El procedimiento de toma de muestra se realizó el día 19 del mes de agosto del año 2014, y se contó con la inestimable colaboración del Dr. Ing. Agrónomo Matías Bailleres, responsable técnico del ensayo de promoción de pasturas.

Para realizar la toma de muestra, se trazó una transecta en cada lote, evitando tomar muestras en accidentes del terreno, como pequeñas lomas o depresiones, que pudiesen presentar características edáficas diferenciadas. Se tomaron 9 muestras por lote, reuniendo un total de 36 muestras para los cuatro lotes. Cada una de las 36 muestras consistió en una porción del horizonte 0 y A de suelo de aproximadamente 30 cm de lado por 30 cm de profundidad, e incluyó al menos un ejemplar de *L. tenuis*. Las muestras se extrajeron utilizando una pala, y luego se colocaron en una bolsa doble de polietileno correctamente rotulada para ser remitida al laboratorio. Se registró además la geolocalización de cada muestra (Figura 4.2).



**Figura 4.2.** Imágenes del procedimiento de toma de muestra. En la foto de la izquierda se observa la línea transecta, señalada por cada una de las bolsas en donde se transportó la muestra. En la imagen de la derecha se observa una muestra individual, junto con la planilla de registro y a un geolocalizador, para indicar la posición de cada una de las muestras.

#### 4.2.2 Caracterización fisicoquímica de los suelos

Los suelos fueron remitidos a la Estación Experimental Agropecuaria Anguil, en la provincia de La Pampa. Las muestras de suelo de los lotes L1 y L2, fueron homogeneizadas en una sola muestra, así como la de los suelos L3 y L4, por pertenecer al mismo corte de suelo, de acuerdo con indicaciones del Ingeniero Bailleres. Ambas muestras (1+2 y 3+4) fueron homogeneizadas por cuarteo previo a su envío.

La Dra. Nanci S. Kloster llevó a cabo el análisis de distintas propiedades fisicoquímicas, a partir de protocolos internos de trabajo. Se presentan a continuación las determinaciones y, de informarse, las referencias bibliográficas en la que está basado cada protocolo:

- Fósforo disponible (Bray & Kurtz, 1945)
- Nitrógeno total (Chemical Methods Soil Science Society of America Book Series, 1996)
- Materia orgánica (Walkley & Black, 1934)
- Textura (Bouyoucos, 1962)
- pH (relación suelo – agua 1:2,5)
- Capacidad de intercambio catiónico (Chemical Methods Soil Science Society of America Book Series, 1996)

- Calcio y magnesio (mediante espectrometría de absorción atómica)
- Sodio y potasio (mediante espectrometría de llama)

Se determinó el porcentaje de humedad en cada uno de los suelos individualmente mediante método gravimétrico. Para esto, se pesó una bandeja de papel aluminio (P1), y luego se agregaron aproximadamente 5 gramos de suelo. Se pesó la bandeja conteniendo el suelo (P2) y se colocó en una estufa a 105°C por 48 horas. Transcurrido este lapso, se retiró de la estufa y se dejó enfriar en desecador. Una vez a temperatura ambiente se realizó otra vez la determinación del peso (P3). Los cálculos se efectuaron de la siguiente manera:

$$\% \text{ de Humedad} = 100 - \left( 100 * \left( \frac{P2 - P3}{P2 - P1} \right) \right)$$

#### **4.2.3 Procesamiento de muestras para análisis biológicos**

##### **4.3.2.1 Muestras de rizosfera-rizoplana**

Una vez en el laboratorio, los ejemplares de *L. tenuis* presentes en cada muestra fueron retirados cuidadosamente del pan de tierra en donde se encontraban. Las raíces fueron agitadas suavemente para deshacerse del suelo débilmente adherido a ellas. Por último, la parte aérea les fue separada y todas las raíces pertenecientes a la misma muestra se reunieron en una bandeja de papel aluminio. Estas muestras fueron rotuladas como “rizosfera-rizoplana individuales”.

Cada una de estas muestras individuales fue pesada y luego colocada en un Erlenmeyer de 250 mL de capacidad, al cual se le agregaron 50 mL de solución de NaCl 0,9%. Se procedió a agitar por 30 minutos a 200 rpm. Transcurrido este tiempo, se retiraron y reservaron los 50 mL de solución sobrenadante (ahora conteniendo el lavado de las raíces), y se agregaron 50mL de una segunda solución de lavado, NaCl 0,9% Tween 80 0,01%. Se sometió a agitación por 30 minutos a 200 rpm. Luego, se retiró el volumen de esta segunda solución, sumándolo a los 50 mL de la primera solución de lavado. En total, se colectaron aproximadamente 100 mL de solución, proveniente de los dos lavados secuenciales. El primer lavado tuvo como objetivo extraer el suelo adherido a la raíz y los microorganismos débilmente adheridos y asociados a partículas de suelo, mientras que el segundo, con el detergente, intentó extraer los microorganismos fuertemente adheridos y localizados en la rizoplana.

Volúmenes de tres extracciones de muestras individuales provenientes del mismo lote se juntaron para crear la muestra “rizosfera-rizoplana compuesta”. La composición de estas muestras compuestas a partir de las muestras individuales se hizo completamente al azar. De cada lote se obtuvieron entonces 3 muestras compuestas. En condiciones de esterilidad, de cada muestra compuesta se tomaron alícuotas para realizar cultivos de enriquecimiento, conservación a -80 °C en microtubos de 2,0 mL, y recuento de bacterias heterótrofas totales (Tabla 4.1).

#### 4.2.3.2 Muestras de Suelos

El suelo remanente de cada muestra, desprovisto de raíces, fue también separado, cuidando de no involucrar suelo que haya estado en contacto con la bolsa de polietileno donde fue transportado. Se tamizaron aproximadamente 100 gramos (tamaño de malla 2,0 mm), que se reservaron en una bandeja de papel aluminio. Estas muestras fueron rotuladas como “suelos individuales”.






Tres muestras de suelo individuales proveniente del mismo lote se unificaron mediante un proceso de cuarteo, para lograr una correcta homogeneizaron. En total, se obtuvieron unos 50 gramos de muestra, denominada “suelos compuesto”. La composición de las muestras compuestas siguió el arreglo aleatorizado previamente realizado para las muestras de rizosfera-rizoplana. En condiciones de esterilidad, de cada muestra compuesta se tomaron alícuotas para realizar cultivos de enriquecimiento, conservación a -80°C en bolsas de poliestireno y recuento de bacterias heterótrofas totales (Tabla 4.1).

#### 4.2.3.3 Conservación de muestras compuestas

La conservación de muestras compuestas de suelo se realizó colocando aproximadamente 30 gramos de suelo por bolsa de poliestireno, para ser luego almacenada a  $-80 \pm 1$  °C. Se conservaron alícuotas de todas las muestras.

La conservación de muestras compuestas de rizosfera-rizoplana se realizó cargando aproximadamente 1,5 mL de muestra en microtubos de 2,0 mL de capacidad. Para cada muestra se usó un total de 5 tubos. El almacenamiento también se hizo a  $-80 \pm 1$  °C, conservándose alícuotas de todas las muestras.

**Tabla 4.1.** Diagrama que muestra el tratamiento de cada una de las 36 muestras tomadas a campo. Del total de muestras tomadas a campo se crearon 24 unidades experimentales compuestas.

Muestra original	Muestras individuales	Procesamiento de muestras individuales	Muestras compuestas	Trabajo realizado en cada una de las muestras compuestas	Codificación de muestras compuestas
	 <p><b>Suelo</b></p>	<p>1º Tamizado (2,0 mm de malla) 2º Determinación de la masa</p>	 <p>Suelo conformado por 3 muestras individuales del mismo lote</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cultivos de Enriquecimiento</li> <li>- Recuento de microorganismos heterótrofos totales</li> <li>- Conservación</li> <li>- Caracterización fisicoquímica</li> </ul>	<p>L1G-278RR - L1G-278BS L1G-935RR - L1G-935BS L1G-146RR - L1G-146BS</p>
	 <p><b>Rizosfera-rizoplana</b></p>	<p>1º Determinación de la masa 2º Extracción secuencial en erlenmeyer</p>	 <p>Extracto proveniente de 3 procesos de extracción individuales</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cultivos de Enriquecimiento</li> <li>- Recuento de microorganismos heterótrofos totales</li> <li>- Conservación</li> </ul>	<p>L2T-297RR - L2T-297BS L2T-368RR - L2T-368BS L2T-154RR - L2T-154BS</p>
				<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cultivos de Enriquecimiento</li> </ul>	<p>L3G-418RR - L3-6418BS L3G-765RR - L3G-765BS L3G-293RR - L3G-293BS</p>
				<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cultivos de Enriquecimiento</li> <li>- Conservación</li> </ul>	<p>L4T-286RR - L4T286BS L4T-974RR - L4T-974BS L4T-513RR - L4T-513BS</p>



#### **4.2.4 Cultivos de enriquecimiento para la obtención de microorganismos degradadores y tolerantes a glifosato**

##### **4.2.4.1 Cultivos de enriquecimiento**

Con el objetivo de aislar microorganismos degradadores y tolerantes a glifosato se realizaron cultivos de enriquecimiento de las muestras compuestas rizosfera-rizoplana y las muestras compuestas de suelo. Para dicha tarea, se utilizó el medio salino basal propuesto por Radosevich (Radosevich et al., 1995), al que se le realizaron las modificaciones necesarias para cumplir con los objetivos específicos de este trabajo. La formulación del medio salino basal adicionado con glifosato (MSB-Gly) consiste en sales inorgánicas de macro y micronutrientes, glucosa ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) como fuente de carbono y energía y glifosato ( $500 \text{ mg L}^{-1}$ ) como única fuente de fósforo (glifosato grado técnico de forma ácida, pureza  $>95\%$ ,) (para conocer en detalle la composición del medio, referirse a la sección S4.1.1). Para inhibir el crecimiento fúngico, se agregó cicloheximida ( $0,100 \text{ g L}^{-1}$ ) a los primeros tres subcultivos.

Durante la preparación del MSB-Gly, las soluciones de macronutrientes y las de micronutrientes se esterilizaron por separado, para evitar la formación de precipitados durante el proceso. Las soluciones madre de glifosato y cicloheximida fueron preparadas y esterilizadas por filtración ( $0,20 \mu\text{m}$ ), y luego agregadas en cantidad adecuada para alcanzar su concentración final en el medio. En cada Erlenmeyer de 250 mL de capacidad se prepararon 50 mL de MSB. Inmediatamente fueron inoculados con 5,000 gramos de muestra de suelo compuesta o 5,00 mL de muestra rizosfera-rizoplana compuesta, según correspondiese. Todo el proceso, que involucró la transferencia de las distintas soluciones y la inoculación, fue realizado en condiciones de esterilidad. Los cultivos de enriquecimientos se incubaron a  $25 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$  y a 200 r.p.m. durante 6 días. Se realizaron un total de 6 cultivos secuenciales o subcultivos para cada Erlenmeyer, donde cada uno fue inoculado con 5,00 mL del cultivo anterior correspondiente.

##### **4.2.4.2 Aislamiento de microorganismos**

Una vez finalizados los 6 subcultivos, se procedió a realizar los aislamientos de microorganismos degradadores y tolerantes. Para el aislamiento se utilizó medio de cultivo sólido en placas de Petri con la misma composición que el medio de enriquecimiento (MSB-Gly) adicionado con  $15 \text{ g L}^{-1}$  de agar.

A partir del último subcultivo, se tomó una alícuota de 0,1 mL para realizar diluciones seriadas en base 10. Luego, estas diluciones fueron sembradas en las placas con medio sólido y se incubaron a  $25 \pm 1$  °C por 5 días.

Transcurrido el período de incubación, y habiéndose observado crecimiento microbiológico, se procedió a realizar los aislamientos en base a la morfología característica de cada colonia. Las colonias fueron seleccionadas por morfotipo, identificadas bajo un código y luego resembradas en estría por agotamiento en medio sólido MSB-Gly fresco. Luego fueron incubadas nuevamente a  $25 \pm 1$  °C por 5 días. A partir de cada colonia aislada, se volvió a sembrar por agotamiento en medio sólido MSB-Gly y en medio R2A (Reasoner and Geldreich, 1985) (S4.1.2) a fin de corroborar su pureza.

#### 4.2.4.3 Conservación de los microorganismos

La conservación de las colonias puras se realizó mediante dos procedimientos diferentes. Cada una de las colonias se resembró en medio líquido MSB-Gly para así obtener una cantidad de biomasa adecuada. Una vez que el cultivo alcanzó su máxima turbidez, una parte de éste se transvasó a un tubo estéril y se realizó una centrifugación a 10.000 rpm y  $10 \pm 1$  °C por 20 minutos. El pellet fue resuspendido en 3 mL de una solución de MSB y glicerol al 40% para luego ser trasvasado en partes iguales a tres criotubos. Los criotubos se almacenaron a  $-80 \pm 1$  °C. El volumen restante del cultivo fue centrifugado de igual modo que el anterior, y el pellet resuspendido en una solución de leche en polvo al 10%. Se trasvasó en partes iguales a tres criotubos, que fueron tapados con torundas de algodón, llevados a congelamiento  $-80 \pm 1$  °C y luego liofilizados. En total, cada colonia purificada se conservó en tres criotubos con glicerol y tres criotubos liofilizados.

Por último, de cada cultivo realizado para la conservación de las cepas se tomó una muestra para ser resembrada por agotamiento en medios sólidos MSB-Gly y R2A, de tal modo de corroborar la pureza del cultivo. Las placas se cultivaron a  $25 \pm 1$  °C por 20 días y luego se almacenaron en la cámara fría por 90 días.

#### 4.2.5 Recuento de microorganismos heterótrofos totales en muestras compuestas

Para estimar la cantidad de microorganismos heterótrofos aeróbicos totales presentes en cada una de las muestras compuestas, se tomó 1,000 g de suelo (o 1,00 mL de muestra rizosfera-rizoplana) y se colocó en un tubo plástico estéril de 15 mL de capacidad, para luego agregar 9 mL de solución

0,9% NaCl Tween 80 0,01% estéril bajo agitación constante por 30 minutos. A partir de la suspensión, se tomó una alícuota de 0,1 mL y se realizaron diluciones seriadas en base 10. Volúmenes de 0,1 mL de cada dilución seriada fueron sembrados por triplicado en placas de Petri conteniendo medio R2A. Las placas se incubaron por 5 días a  $25 \pm 1$  °C.

El recuento se realizó en aquellas placas que mostraron un número de unidades formadoras de colonia (UFC) comprendido entre 30 y 300. Para la expresión del resultado en muestras de suelos, se contempló el número de diluciones y la humedad relativa del suelo original, informándose el número de UFC por gramo de suelo seco ( $\text{UFC g}^{-1}$ ). Para la expresión de resultados en muestras de rizosfera-rizoplana, se contempló el número de diluciones y la masa de raíces de la cual se realizó la extracción, informándose el número de UFC por gramo de peso fresco de raíz ( $\text{UFC g}^{-1}$ ).

#### **4.2.6 Asilamiento de ADN de distintas muestras compuestas**

El ADN genómico de las muestras de suelo fue aislado utilizando el kit comercial MO BIO PowerSoil® DNA Isolation (MO BIO Laboratories, Carlsbad, EE. UU.). Debido a la naturaleza líquida de las muestras de rizosfera-rizoplana, el aislamiento de ADN se realizó en tándem, utilizando el kit Qiagen DNeasy® Blood and Tissue (Qiagen, Hilden, Alemania) seguido del kit MO BIO PowerSoil® DNA Isolation. Esto fue necesario ya que el extracto líquido obtenido de suelos de esta naturaleza presentaba altas cantidades de materia húmica y baja concentración de partículas de suelo. Ambos protocolos de purificación se llevaron a cabo de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

#### **4.2.7 Análisis las comunidades microbianas en muestras de suelo y de rizosfera-rizoplana**

Con el objetivo de estudiar la diversidad de las distintas comunidades microbianas en las muestras compuestas de suelo y de rizosfera-rizoplana, se utilizó la metodología de análisis automatizado de espaciador intergénico ribosómico (o ARISA, por sus siglas en inglés Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis). ARISA es un método que estima las unidades taxonómicas operacionales en una muestra (OTUs), basado en la heterogeneidad de longitud de la región espaciadora intergénica (ISR) bacteriana presente entre gen del ARN ribosomal 16S y el gen del ARN ribosomal 23S.

El procedimiento para todas las muestras se llevó a cabo en cuatro etapas diferentes. La primera consistió en el aislamiento del ADN de la matriz de origen, la segunda en realizar una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la región espaciadora interna transcrita (ITS), la tercera en la

separación de los fragmentos amplificados mediante electroforesis capilar, y la cuarta en el análisis e interpretación de los electroferogramas obtenidos mediante el uso de softwares específicos.

Las muestras compuestas de suelos se procesaron por “duplicado biológico”, lo que generó un total de 6 perfiles de ARISA por cada lote.

La PCR de la región ITS, que se encuentra entre el gen que codifica al ARNr 16s y el ARNr 23S se llevó a cabo usando el conjunto de primers forward: TGCGGCTGGATCCCCTCCTT - reverse: CCGGGTTTCCCCATTCGG (Sillen et al., 2015). Los productos de amplificación fueron chequeados mediante electroforesis en gel de agarosa 1%. Las condiciones de PCR fueron:

**Tabla 4.2.** Volúmenes de reacción de la PCR

Reactivo	Volumen (uL)
Buffer de reacción 10X	2,5
MgSO <sub>4</sub> 50 mM	1,0
dNTP mix 25 mM	0,5
Primer fwd 10 uM	0,5
Primer rev 10 uM	0,5
Agua	19,4
Platinum Taq® High Fidelity	0,12
ADN	1,0

**Tabla 4.3.** Ciclo de PCR. El recuadro azul indica el ciclo de amplificación, que se repitió 25 veces.

Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
94,0	3,0
94,0	1,0
55,0	0,5
72,0	1,0
72,0	5,0

Los productos de amplificación fueron cargados en chips Agilent DNA 1000, para luego llevar a cabo electroforesis capilar automatizada basada en la detección de fragmentos de ADN mediante fluorescencia, usando el equipo 2100 Bioanalyzer® (Agilent Technologies, Diegem, Bélgica). Luego de cada corrida se obtuvieron a partir del software del equipo, los electroferogramas y perfiles densitométricos para cada muestra.

Los electroferogramas y perfiles densitométricos de cada muestra se exportaron y se procesaron utilizando el paquete StatFingerprints, en la versión de software R v2.13 (<http://cran.at.r-project.org>). Los análisis estadísticos y gráficos se llevaron a cabo utilizando el programa PAleontological Statistics (PAST) v3.14 (Hammer et al., 2001) y GraphPad v5.1.

## 4.3 Resultados y discusión

### 4.3.1 Caracterización fisicoquímica de los suelos

Se llevó a cabo la caracterización textural y fisicoquímica de los suelos correspondientes a los dos pares de lotes (L1+L2 y L3+L4), de orden Molisol, suborden Acuol, gran grupo Natracuol y subgrupo Típico, de acuerdo con la información suministrada por la chacra experimental Manantiales en base a los criterios de taxonomía de suelos del ministerio de agricultura de los Estados Unidos (USDA). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.4.

**Tabla 4.4.** Caracterización fisicoquímica de suelos.

Determinación		Suelos	
		L1 y L2	L3 y L4
Textura (%)	Arcilla	23	18
	Limo	46	50
	Arena	31	32
Elemento	P mg Kg <sup>-1</sup>	6,36	8,62
	N %	0,256	0,206
	K mEq 100g <sup>-1</sup>	1,1	1,1
	Ca mEq 100g <sup>-1</sup>	20	7,6
	Na mEq 100g <sup>-1</sup>	8,6	7,0
	Mg mEq 100g <sup>-1</sup>	0,4	8,6
pH		8,3	6,8
Materia Orgánica (%)		5,9	4,5
CIC (mEq 100g <sup>-1</sup> )		6,7	7,4

Los resultados muestran que ambos suelos poseen textura franca, con muy bajos valores de fósforo, característico de la región de la pampa deprimida, con muy alto contenido en sodio y una muy baja capacidad de intercambio catiónico. Presentan también una adecuada cantidad de materia orgánica y valores normales de relación C/N (estimados en base el contenido de MO). Los suelos L1 y L2 son ligeramente alcalinos mientras que los suelos L3 y L4 son neutros. Es posible que los aún más bajos valores de fósforo en los suelos L1 y L2 se correlacionen con la alta cantidad de iones Ca, y con el valor de pH alcalino, haciendo el fósforo menos biodisponible (favoreciendo la forma de Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>).

El moderado contenido de arcillas y la presencia de metales divalentes en los suelos (ya sea Ca para suelo L1 y L2 o Ca + Mg para suelo L3 y L4) podrían jugar un papel relevante en la adsorción de glifosato, por mediarse interacciones entre el grupo fosfonato de la molécula y los iones divalentes, ya sea en forma libre como así también los que conforman los distintos minerales de la arcilla.

En contraposición a lo discutido en el párrafo anterior, el pH neutro a alcalino presente en estos suelos, junto con las altas concentraciones de materia húmica encontradas, podría causar una mayor tasa de lixiviación y escorrentía de la molécula.

En definitiva, el grado en el que el glifosato aplicado periódicamente quede adsorbido a un determinado suelo dependerá de la integración de todos los fenómenos complejos en los que cada componente toma parte. El fósforo como elemento externo (fertilizante) fue especialmente estudiado, y como también se discutió con anterioridad, existe evidencia que el grupo fosfonato del glifosato compite por los sitios de unión de los fosfatos solubles. En la situación que presentan estos suelos, podría verse muy favorecida la adsorción y por ende retención de glifosato debido a su bajo contenido de fósforo. Esta combinación de efectos es particularmente importante desde la perspectiva ambiental, porque ayuda a reducir la movilidad de una molécula que no presenta grandes niveles de residualidad en suelo, pero sí contamina los cursos de agua que reciben los escurrimientos de las zonas de cultivo.

Por otra parte, estos resultados validan el diseño de muestreo, ya que la decisión de buscar microorganismos tolerantes y degradadores en los lotes estudiados no se basó solamente en el tratamiento de promoción allí llevado a cabo, sino también en el hecho de que los contenidos de fósforo soluble en la región de la Pampa deprimida son muy bajos, pudiéndose favorecer la presencia de microorganismos capaces de metabolizar grupos fosfonatos.

#### **4.3.2 Toma de muestra y aislamiento de microorganismos**

A partir de las 36 muestras originales remitidas al laboratorio, se conformaron las muestras compuestas, las cuales fueron sometidas a la totalidad de estudios planificados durante este capítulo. Inicialmente se determinaron los contenidos de humedad de los suelos, para luego proseguir en paralelo con los ensayos de enriquecimiento, aislamiento y recuento de microorganismos heterótrofos totales.

Durante el trabajo de disección de cada una de las muestras originales para obtener tanto suelo como raíces, se pudo observar que los lotes tratados L1 y L3 mostraron mayor número de especímenes de *Lotus*, respecto a los lotes control L2 y L4, lo que se vió reflejado en una mayor biomasa de raíces obtenidas (diferencias estadísticamente significativas entre L3 y L4,  $n = 22$ ,  $p < 0,05$ ), lo que es coherente con el objetivo de la promoción mediante el uso de glifosato (Tabla 4.5). Las diferencias observadas en la humedad promedio de cada lote (la humedad parecería ser mayor en los lotes testigo que en los lotes tratamiento, tabla 4.6), podría estar también relacionada a la observación anterior, ya que, aunque los lotes bajo tratamiento tienen una mayor cantidad de especímenes de *Lotus* respecto a los lotes control, tienen una menor cobertura, pudiendo causar una mayor pérdida de humedad.

**Tabla 4.5.** Biomasa promedio de raíces extraídas para cada lote.

Sitio de muestra	Masa de raíz (g)
Lote 1	$2,9 \pm 1,6$
Lote 2	$2,4 \pm 1,1$
Lote 3	$4,3 \pm 2,6$
Lote 4	$0,35 \pm 0,14^*$

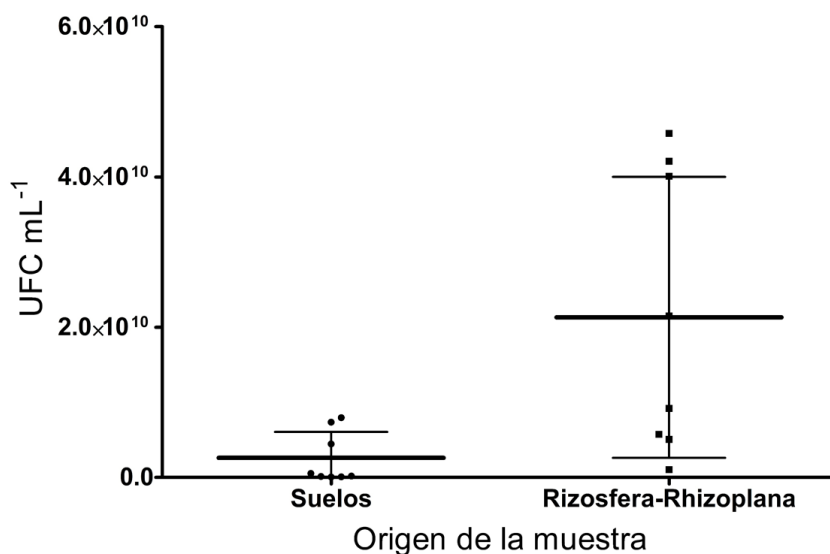
\*estadísticamente significativo respecto a Lote 3 ( $n = 22$ ,  $p < 0,05$ )

**Tabla 4.6.** Contenidos de humedad promedio para cada lote.

Sitio de muestra	Humedad (%)
Lote 1	$28,0 \pm 7,0$
Lote 2	$33,0 \pm 8,5$
Lote 3	$14,3 \pm 0,7$
Lote 4	$17,3 \pm 1,9$

En cuanto al aislamiento de microorganismos, una vez finalizados los 6 subcultivos en MSB-Gly para cada una de las muestras compuestas, la totalidad de Erlenmeyers (24) presentaron turbidez, con desarrollos máximos entre los días segundo a cuarto en promedio. Los cultivos que fueron inicialmente inoculados con muestras compuestas de rizosfera-rizoplana presentaron, en promedio, una mayor densidad celular respecto a aquellos inicialmente inoculados con muestras de suelo (Figura 4.3)

Todos los cultivos fueron sembrados en placas con MSB-Gly para poder obtener colonias susceptibles de ser purificadas mediante métodos clásicos de microbiología.



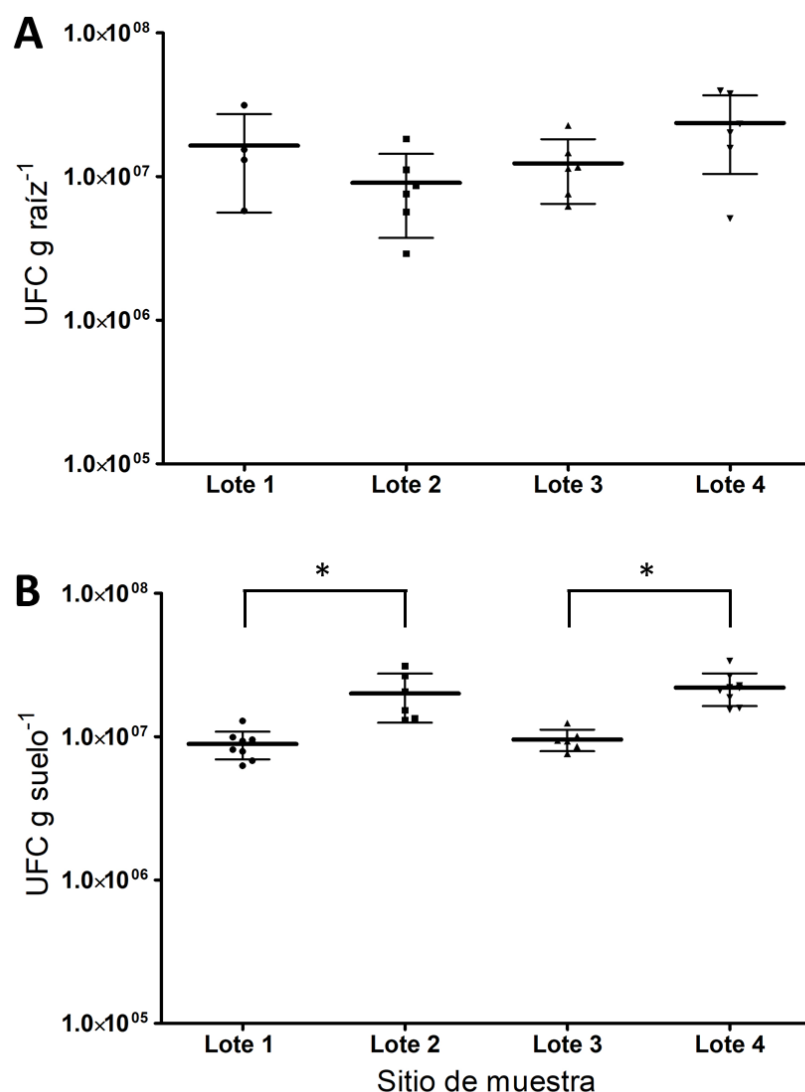
**Figura 4.3.** Número de UFC mL<sup>-1</sup> observado en los cultivos celulares de acuerdo al origen de la muestra. Las diferencias son significativas con un  $p < 0,05$ . La barra gruesa corresponde a la media, mientras que las barras delgadas representan el desvío estándar.

Morfológicamente, luego de una semana de crecimiento en placa se vio que en la mayoría de las placas había desarrollado un solo morfotipo de colonia distinguible, proveniente de cada cultivo de enriquecimiento. Cada una de estas colonias se purificó, corroborando pureza en placas con distintos medios de cultivo, y luego se volvieron a cultivar en medio líquido MSB-Gly. Del total de colonias purificadas originalmente, 24 pudieron volver a crecer y desarrollar una buena densidad celular. Esos 24 cultivos fueron conservados según los distintos métodos mencionados en el punto 4.2.2.3 para poder realizar, una vez asegurada la supervivencia al proceso de conservación durante tres meses, las caracterizaciones correspondientes. En el capítulo 5 se desarrolla en detalle la caracterización bioquímica y molecular de estos microorganismos.

#### 4.3.3 Recuento de microorganismos heterótrofos totales en muestras compuestas

Paralelamente a los procedimientos descritos en el apartado anterior, se realizó el recuento de heterótrofos totales en las muestras compuestas de suelo y de raíz. Los resultados se presentan en la figura 4.4 A y B.





**Figura 4.4.** A. Número de unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de raíz. No se observan diferencias significativas entre los distintos sitios de muestreo. B. Número de UFC por gramo de suelo seco. Existen diferencias significativas entre Lote 1 y Lote 2 ( $p < 0.01$ ), así como también entre Lote 3 y Lote 4 ( $p < 0.01$ ).

El promedio total de UFC por gramo de raíz obtenido fue de  $1,54 \cdot 10^7$ , sin observarse diferencias significativas entre los diferentes lotes (Figura 4.4A).

El número de microorganismos cultivables obtenidos durante un aislamiento responde esencialmente a tres factores, que son: i) el número de microorganismos inicialmente presentes en la muestra, ii) método de aislamiento utilizado, y iii) el medio de cultivo utilizado.

El método de aislamiento para suelos rizosféricos depende directamente de la definición que se utilice de rizosfera (Hartmann et al., 2008), y la relevancia que se le dé a la rizoplanea (zona de contacto físico entre raíz y suelo) como fuente de recursos biológicos relevantes. Así es que, en algunos

procedimientos, remueven el suelo débilmente asido a la raíz mediante agitación mecánica vigorosa (Park et al., 2005; Huang, 2018) en un primer momento (suelo *bulk*), para luego sacudir una segunda vez, más intensamente, o simplemente removiendo el suelo de la raíz manualmente. La recolección del suelo desprendido en esta segunda etapa (suelo rizosférico) es la muestra que se usa para llevar a cabo el aislamiento. En otros trabajos, se realiza una primera agitación para desprender el suelo débilmente adherido, y luego se transfiere a un tubo o reservorio con solución de extracción, cuyo fin es desprender el suelo adherido fuertemente a las raíces, pero también a aquellas bacterias adheridas directamente a ellas (Barillot et al., 2013; Hammami et al., 2013).

Esta aproximación fue la elegida para el objetivo particular propuesto, ya que consideramos a los microorganismos de la rizoplanea de gran importancia para la estrategia biotecnológica planteada. Por ello también, y con la intención de eliminar errores en el procedimiento producto de la manipulación de la raíz, es que se decidió expresar el resultado en función del peso fresco de raíz. De esta forma, si bien no obtenemos valores para comparar “*gramo a gramo*” el suelo *bulk* con el suelo rizosférico, podemos tener una estimación bastante buena de la reproducibilidad del método de extracción de microorganismos de rizosfera. Este dato es muy relevante cuando se trata de procedimientos desarrollados “*in-house*”. Al no haber diferencias significativas, entre los distintos valores de muestras compuestas rizosfera-rizoplanea, podemos asumir que el procedimiento de extracción de microorganismos no va a actuar como una fuente de sesgo en futuros análisis.

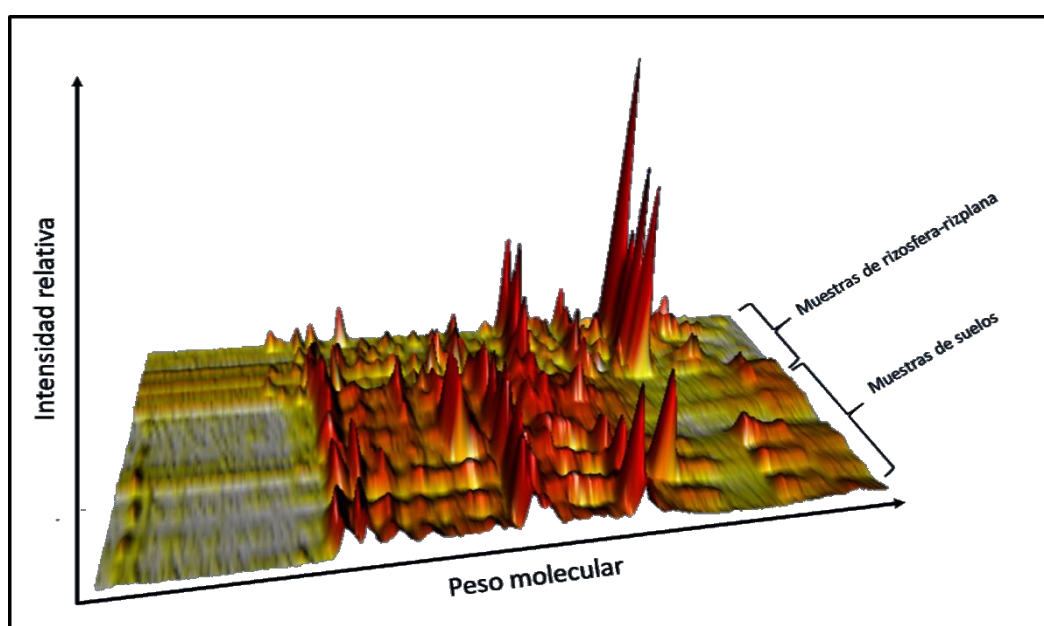
En lo que respecta al medio de cultivo utilizado para el recuento, se priorizó la utilización de aquel que presentara una composición de nutrientes compleja (Balestra and Misaghi, 1997; Vieira and Nahas, 2005) y además estuviese indicado para el crecimiento de aquellos microorganismos de crecimiento lento, como es el medio R2A.

Al analizar promedio total de UFC por gramo en las muestras compuestas de suelo, se observó que los valores se encontraron dentro de los rangos esperados para suelos agronómicos (Whitman et al., 1998), y a su vez, se encontraron diferencias significativas entre ambos suelos tratamiento y sus respectivos suelos control (Figura 4.4B). En este caso, podría asignarse al tratamiento (o a sus consecuencias, como una diferencia en la cobertura) como el responsable de la diferencia en el número de colonias cultivables.

#### **4.3.4 Estudios de las comunidades microbianas**

Al proponer una estrategia de rizorremediación basada en el bioaumento, cobra sentido la exploración de las comunidades microbianas, para poder conocer si el cambio de las propiedades edáficas o el tratamiento crónico con el contaminante tienen un impacto en ésta.

El sistema Bioanalyzer®, entregó electroferogramas mostrando perfiles de fluorescencia con picos de mayor o menor intensidad, ordenados de acuerdo con su peso molecular (expresado en pares de base). Estos perfiles se tradujeron en una matriz de intensidad de señal y peso molecular para cada muestra, la cual fue exportada y analizada en el software StatFingerprints. Utilizando este software, se procesó cada perfil para luego realizar los correspondientes análisis estadísticos. En la figura 4.5 se muestran dichos perfiles.

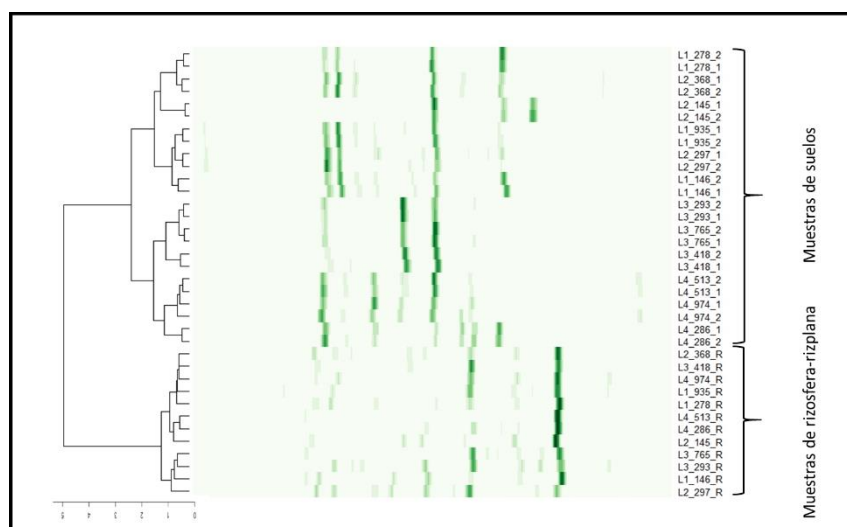


**Figura 4.5.** Perfiles de ARISA en 3D de las muestras de suelo y rizosfera-rizoplana, luego de ser procesados para su posterior análisis.

Inicialmente se llevó a cabo un análisis de *clustering* de estos perfiles, para conocer el grado de similitud entre ellos, utilizando el índice de similitud *Bray-Curtis*, cuyo criterio de similitud contempla abundancias, en conjunción con el algoritmo de Ward para graficar el dendrograma. El resultado se muestra en la figura 4.6.

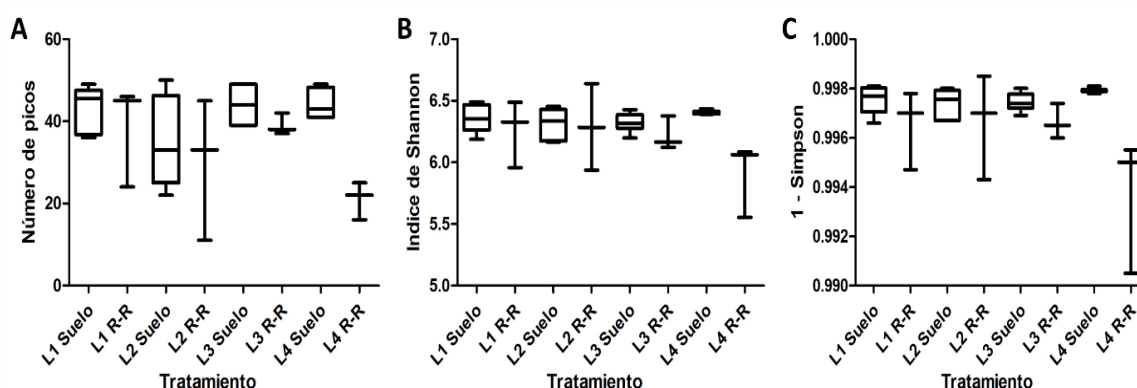
De acuerdo con los resultados obtenidos, puede observarse que existe una gran separación entre las muestras de suelo y las de rizosfera-rizoplana, representados en los dos clados más importantes. Se observa también que, dentro del clado correspondiente a las muestras de suelo, aquellas

correspondientes a L1 y L2 agrupan juntas en un mismo clado, mientras que aquellas correspondientes a L3 y L4 agrupan en otro.



**Figura 4.6.** Análisis de *cluster* del conjunto total de muestras compuestas. En la parte izquierda se observa el dendrograma, al cual se asocia en la parte central, el perfil de ARISA en 2D. En la parte derecha se indican los nombres de cada muestra.

El análisis continuó mediante la comparación de distintos índices de alfa diversidad. Se consideraron tres de ellos: Número de picos (como indicador de riqueza), índice de Shannon y el 1-índice de Simpson. Los resultados mostraron que no existen diferencias significativas entre las muestras de suelos ni entre las muestras rizosféricas-rizoplana para ningún parámetro analizado (ANOVA y test *post hoc* de Tukey, con un nivel de significancia  $\alpha = 0,05$ ), con excepción de la muestra de rizosfera-rizoplana correspondiente al lote L4 (control del lote L3), que difiere significativamente de todos los suelos (Shannon y 1-Simpson) y de la muestra de rizosfera-rizoplana de L3 (1-Simpson).



**Figura 4.7.** Índices de alfa diversidad obtenidos a partir de los electroferogramas de las muestras compuestas. A. Número de picos. B. Índice de Shannon. C. 1-Índice de Simpson. Se representan para cada muestra la media y los desvíos estándar ( $n=6$  para muestras de suelo,  $n=3$  para muestras de rizosfera-rizoplana)

El método escalamiento multidimensional (non-metric multidimensional scaling, nMDS) utilizando la métrica de distancia de *Bray-Curtis* también se utilizó para comparar la estructura de las comunidades correspondientes a las distintas muestras compuestas. Cada una de las muestras se representa en un espacio de dos dimensiones, en donde la proximidad entre los objetos corresponde con un mayor grado de similitud entre ellos (Ramette, 2007). Para evaluar las diferencias entre distintos grupos de muestras, se utilizó el análisis de similitudes (ANOSIM) con 9999 permutaciones. En la figura 4.8 se muestran distintos gráficos de nMDS indicándose en el pie del gráfico a qué comparaciones corresponden. Así mismo, y al costado derecho de cada gráfico, se muestra el estrés asociado a la generación de cada gráfico, el estadístico R y p (significancia) referidos a cada análisis de similitud entre los grupos indicados entre elipses.

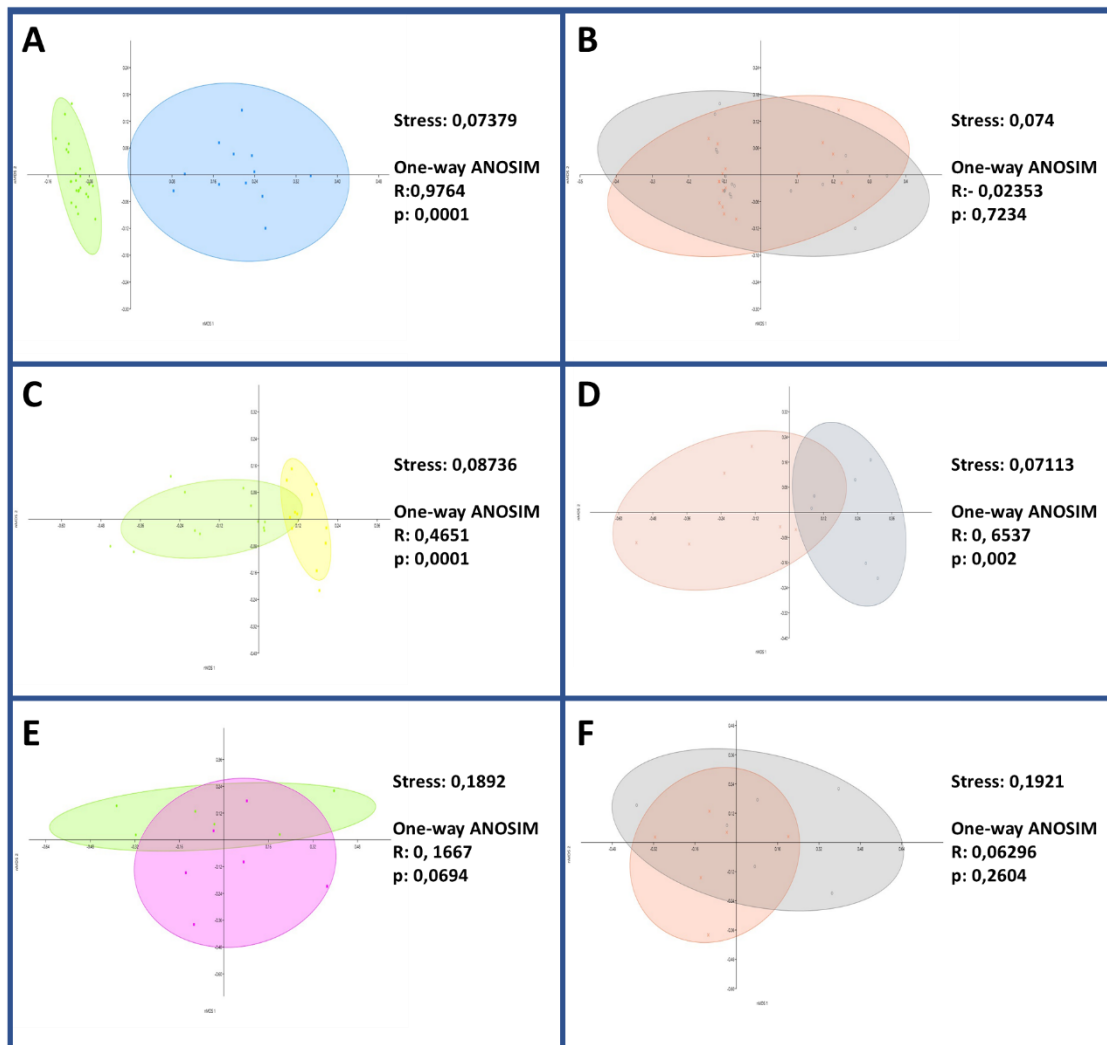
A partir de los gráficos de nMDS podemos observar en forma clara las distancias entre cada uno de los perfiles de ARISA. Podemos ver que estadísticamente (R: 0,97, p: 0,001), existe una diferencia entre muestras de suelo y muestras rizosféricas-rizoplánicas (Figura 4.8A). Podemos ver también que, haciendo un análisis global de la totalidad de muestras tratadas y comparándolas contra la totalidad de las muestras control, el tratamiento no provocaría diferencias significativas en la estructura de las comunidades (Figura 4.8B).

Cuando estudiamos los suelos por separado, vemos que existe una leve separación entre los distintos tipos de suelo (Figura 4.8C), indicando que las comunidades podrían verse influenciadas por los factores edáficos, conclusión ya reportada en bibliografía utilizando otros métodos de *fingerprinting* (Kuramae et al., 2012; Bajsa et al., 2013).

Al observar la distribución individual de cada muestra de suelo, compararon también suelos L3 y L4, que enfrenta suelo tratado versus suelo control (Figura 4.8D). El estadístico en este caso entrega una separación mayor y un menor grado de solapamiento para un buen grado de significancia (R:0,6537, p: 0,002). Otros estudios realizados en suelos agrícolas donde se realizan periódicamente distintos manejos agronómicos asociados al uso de glifosato, también muestran cambios en la estructura de comunidades de suelo y rizosféricas ( Ratcliff et al., 2006; Kremer & Means, 2009; Vera et al., 2010; Lane et al., 2012; Newman et al., 2016b). Cuando se compararon los suelos L1 vs L2, no se obtuvo diferencia significativa ni se observó tampoco separación alguna (información no suministrada).

Por último, las muestras rizosfera-rizoplana no mostraron diferencias significativas ni separación entre ellas, ya sea a partir de comparar los lotes de origen (Figura 4.8E) ni el tratamiento recibido (Figura 4.8F). Esto indicaría que el efecto rizosférico es más importante que las características edáficas

o el método de promoción de pastura con glifosato al momento de explicar las diferencias entre las distintas comunidades microbianas.



**Figura 4.8.** Gráficas de nMDS para distintas combinaciones de muestras. Las elipses en los gráficos de la izquierda representan el 95% confianza para la media grupal, mientras que las de la derecha, el 68%.

A- Comparación entre todas las muestras de suelo (verde) y todas las muestras de rizosfera-rizoplana (azul)

B- Comparación entre todas las muestras provenientes de lotes tratados (L1 y L3, en color salmón) y todas las muestras provenientes de lotes control (L2 y L4, en color gris).

C- Comparación entre muestras de suelo provenientes de los lotes L1 y L2 (verde) y suelos de los lotes L3 y L4 (amarillo)

D- Comparación entre muestras de suelos de los lotes L3 (tratado, color salmón) y L4 (control, color gris).

E- Comparación entre muestras de rizosfera-rizoplana de los lotes L1 y L2 (verde) y suelos de los lotes L3 y L4 (violeta).

F- Comparación entre las muestras rizosfera-rizoplana provenientes de lotes tratados (L1 y L3, en color salmón) y las muestras rizosfera-rizoplana provenientes de lotes control (L2 y L4, en color gris).

## 4.4 Conclusiones

A partir del trabajo realizado durante el muestreo, se logró obtener un banco de cepas puras provenientes de distintos tipos de matrices. El proceso de extracción diseñado para microorganismos de rizosfera-rizoplana permitió alcanzar rendimientos en el orden de  $10^7$  UFC g<sup>-1</sup> raíz, valores más que aceptables para realizar el subsecuente enriquecimiento y aislamiento.

La caracterización fisicoquímica y el estudio de la estructura de comunidades de los suelos permitieron validar la toma de decisiones realizada durante la planificación del muestreo. En este sentido, asumiendo una posible diferencia entre las comunidades microbianas de ambas matrices, se decidió muestrear tanto suelo desprovisto de raíces de Lotus como suelo rizosférico-rizoplánico, diferencia que fue corroborada posteriormente por la técnica de *fingerprinting* utilizada.

Se presentó también la posibilidad de realizar el muestreo en dos lotes bajo uso intensivo de glifosato, junto con sus respectivos suelos control, los cuales lógicamente presentaban una cobertura vegetal distinta como resultado de la presión de selección diferencial impuesta por el tratamiento. Ambos suelos presentaron, en concordancia con lo indicado por el personal de la chacra experimental, características edáficas distintas; sin embargo, estas diferencias se vieron débilmente reflejadas en sus comunidades microbianas.

En cuanto a la influencia del tratamiento de promoción de Lotus, se observó un efecto cuantitativo en suelos, siendo menor el número de microorganismos heterótrofos totales presentes en los suelos tratados, respecto a los suelos control; y un débil efecto cualitativo al comparar la estructura de las comunidades de los suelos L3 y L4.

Las muestras rizosfera-rizoplana presentaron, como se mencionó anteriormente, comunidades bien diferenciadas respecto a la de los suelos, pero no pudieron verse en ellas diferencias significativas ni en cuanto al lote de origen ni al tratamiento. Esta observación abre la puerta en un futuro al estudio de la influencia que esta leguminosa pudiese tener en las comunidades que habitan su rizosfera, y su resiliencia respecto a los distintos manejos agronómicos, que involucran el uso de distintos agroquímicos. En lo que respecta a una estrategia de rizorremediación, este fenómeno podría ser muy apreciado al momento de realizar inoculaciones con distintos microorganismos, ya que trabajar con microorganismos que son parte de esta estructura comunitaria modulada por la raíz podría ser una garantía de estabilidad en la misma.

Teniendo en cuenta las variaciones edáficas que se suceden en la extensión de la Pampa Húmeda, el análisis de las propiedades fisicoquímicas del suelo es un elemento clave al momento de plantear una estrategia de remediación como la que se quiere llevar a cabo. El proceso de implantación y sobrevida de la especie vegetal dependerá, en gran medida, del impacto que las características edáficas y condiciones del terreno tengan sobre ésta. Futuros ensayos de rizorremediación deberán incluir las determinaciones fisicoquímicas habitualmente realizadas para caracterizar cualquier lote de uso agronómico, resultados que servirán para comparar con los aquí obtenidos.



## 4.5 Referencias

- Bajsa, N., Morel, M. A., Brăna, V., and Castro-Sowinski, S. (2013). The Effect of Agricultural Practices on Resident Soil Microbial Communities: Focus on Biocontrol and Biofertilization. *Mol. Microb. Ecol. Rhizosph.* 2, 687–700. doi:10.1002/9781118297674.ch65.
- Balestra, G. ., and Misaghi, I. . (1997). Increasing the efficiency of the plate counting method for estimating bacterial diversity. *J. Microbiol. Methods* 30, 111–117. doi:10.1016/S0167-7012(97)00056-0.
- Barillot, C. D. C., Sarde, C. O., Bert, V., Tarnaud, E., and Cochet, N. (2013). A standardized method for the sampling of rhizosphere and rhizoplan soil bacteria associated to a herbaceous root system. *Ann. Microbiol.* 63, 471–476. doi:10.1007/s13213-012-0491-y.
- Bell, T. H., Joly, S., Pitre, F. E., and Yergeau, E. (2014). Increasing phytoremediation efficiency and reliability using novel omics approaches. *Trends Biotechnol.* 32, 271–280. doi:10.1016/j.tibtech.2014.02.008.
- Bouyoucos, G. J. (1962). Hydrometer Method Improved for Making Particle Size Analyses of Soils<sup>1</sup>. *Agron. J.* 54, 464. doi:10.2134/agronj1962.00021962005400050028x.
- Bray, R. H., and Kurtz, L. T. (1945). Determination of Total, Organic, and Available Forms of Phosphorus in Soils. *Soil Sci.* 59, 39–46. doi:10.1097/00010694-194501000-00006.
- Chemical Methods Soil Science Society of America Book Series (1996). *Soil Sci. Soc. Am.*
- Figueiredo, M. do V. B., Seldin, L., de Araujo, F. F., and Mariano, R. de L. R. (2010). “Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Fundamentals and Applications,” in, 21–43. doi:10.1007/978-3-642-13612-2\_2.
- Gerhardt, K. E., Gerwing, P. D., and Greenberg, B. M. (2017). Opinion: Taking phytoremediation from proven technology to accepted practice. *Plant Sci.* 256, 170–185. doi:10.1016/j.plantsci.2016.11.016.
- Gerhardt, K., Huang, X., Glick, B., and Greenberg, B. (2009). Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges. *Plant Sci.* 176, 20–30. doi:10.1016/j.plantsci.2008.09.014.
- Hammami, I., Hsouna, A. Ben, Hamdi, N., Gdoura, R., and Triki, M. A. (2013). Isolation and

- characterization of rhizosphere bacteria for the biocontrol of the damping-off disease of tomatoes in Tunisia. *Comptes Rendus - Biol.* 336, 557–564. doi:10.1016/j.crvi.2013.10.006.
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T. a. T., and Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontol. Electron.* 4(1), 1–9. doi:10.1016/j.bcp.2008.05.025.
- Hartmann, A., Rothballer, M., and Schmid, M. (2008). Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant Soil* 312, 7–14. doi:10.1007/s11104-007-9514-z.
- Huang, Y. hong (2018). Comparison of rhizosphere and endophytic microbial communities of Chinese leek through high-throughput 16S rRNA gene Illumina sequencing. *J. Integr. Agric.* 17, 359–367. doi:10.1016/S2095-3119(17)61731-3.
- Jambon, I., Thijs, S., Weyens, N., and Vangronsveld, J. (2018). Harnessing plant-bacteria-fungi interactions to improve plant growth and degradation of organic pollutants. *J. Plant Interact.* 13, 119–130. doi:10.1080/17429145.2018.1441450.
- Kremer, R. J., and Means, N. E. (2009). Glyphosate and glyphosate-resistant crop interactions with rhizosphere microorganisms. *Eur. J. Agron.* 31, 153–161. doi:10.1016/j.eja.2009.06.004.
- Kuramae, E. E., Yergeau, E., Wong, L. C., Pijl, A. S., Van Veen, J. A., and Kowalchuk, G. A. (2012). Soil characteristics more strongly influence soil bacterial communities than land-use type. *FEMS Microbiol. Ecol.* 79, 12–24. doi:10.1111/j.1574-6941.2011.01192.x.
- Lane, M., Lorenz, N., Saxena, J., Ramsier, C., and Dick, R. P. (2012). Microbial activity, community structure and potassium dynamics in rhizosphere soil of soybean plants treated with glyphosate. *Pedobiologia (Jena)*. 55, 153–159. doi:10.1016/j.pedobi.2011.12.005.
- Newman, M. M., Hoilett, N., Lorenz, N., Dick, R. P., Liles, M. R., Ramsier, C., et al. (2016a). Glyphosate effects on soil rhizosphere-associated bacterial communities. *Sci. Total Environ.* 543, 155–160. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.11.008.
- Newman, M. M., Lorenz, N., Hoilett, N., Lee, N. R., Dick, R. P., Liles, M. R., et al. (2016b). Science of the Total Environment Changes in rhizosphere bacterial gene expression following glyphosate treatment. *Sci. Total Environ.* 553, 32–41. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.02.078.
- Park, M., Kim, C., Yang, J., Lee, H., Shin, W., Kim, S., et al. (2005). Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. *Microbiol. Res.* 160, 127–133. doi:10.1016/j.micres.2004.10.003.

- Radosevich, M., Traina, S. J., Hao, Y. L., and Tuovinen, O. H. (1995). Degradation and mineralization of atrazine by a soil bacterial isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 297–302.
- Ramette, A. (2007). Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiol. Ecol.* 62, 142–160. doi:10.1111/j.1574-6941.2007.00375.x.
- Ratcliff, A. W., Busse, M. D., and Shestak, C. J. (2006). Changes in microbial community structure following herbicide (glyphosate) additions to forest soils. *Appl. Soil Ecol.* 34, 114–124. doi:10.1016/j.apsoil.2006.03.002.
- Reasoner, D. J., and Geldreich, E. E. (1985). A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 1–7.
- Reichenauer, T. G., and Germida, J. J. (2008). Phytoremediation of organic contaminants in soil and groundwater. *ChemSusChem* 1, 708–717. doi:10.1002/cssc.200800125.
- Sammons, R. D., and Gaines, T. A. (2014). Glyphosate resistance: State of knowledge. *Pest Manag. Sci.* 70, 1367–1377. doi:10.1002/ps.3743.
- Sillen, W. M. A., Thijs, S., Abbamondi, G. R., Janssen, J., Weyens, N., White, J. C., et al. (2015). Effects of silver nanoparticles on soil microorganisms and maize biomass are linked in the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* 91, 14–22. doi:10.1016/j.soilbio.2015.08.019.
- Thijs, S., and Vangronsveld, J. (2015). “Rhizoremediation,” in *Principles of Plant-Microbe Interactions* (Cham: Springer International Publishing), 277–286. doi:10.1007/978-3-319-08575-3\_29.
- Thompson, I. P., Van Der Gast, C. J., Ciric, L., and Singer, A. C. (2005). Bioaugmentation for bioremediation: The challenge of strain selection. *Environ. Microbiol.* 7, 909–915. doi:10.1111/j.1462-2920.2005.00804.x.
- Tyagi, M., da Fonseca, M. M. R., and de Carvalho, C. C. C. R. (2011). Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation* 22, 231–241. doi:10.1007/s10532-010-9394-4.
- Vangronsveld, J., Herzig, R., Weyens, N., Boulet, J., Adriaensen, K., Ruttens, A., et al. (2009). Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 16, 765–794. doi:10.1007/s11356-009-0213-6.
- Vera, M. S., Lagomarsino, L., Sylvester, M., Pérez, G. L., Rodríguez, P., Mugni, H., et al. (2010). New evidences of Roundup®(glyphosate formulation) impact on the periphyton community and the water quality of freshwater ecosystems. *Ecotoxicology* 19, 710–721. doi:10.1007/s10646-009-

0446-7.

Vieira, F. C. S., and Nahas, E. (2005). Comparison of microbial numbers in soils by using various culture media and temperatures. *Microbiol. Res.* 160, 197–202. doi:10.1016/j.micres.2005.01.004.

Walkley, A., and Black, I. A. (1934). an Examination of the Degtjareff Method for Determining Soil Organic Matter, and a Proposed Modification of the Chromic Acid Titration Method. *Soil Sci.* 37, 29–38. doi:10.1097/00010694-193401000-00003.

Whitman, W. B., Coleman, D. C., and Wiebe, W. J. (1998). Prokaryotes: The unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 6578–6583. doi:10.1073/pnas.95.12.6578.

## S4.1 Material suplementario

### S4.1.1 Medio mínimo basal con glifosato como única fuente de carbono (MSB-Gly)

Compuesto	Cantidad (g L <sup>-1</sup> )
Glucosa	2,000
MgSO <sub>4</sub>	0,244
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,500
NaHCO <sub>3</sub>	0,175
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,015
CaCl <sub>2</sub>	8,6 mg
MnCl <sub>2</sub>	0,16 mg
ZnSO <sub>4</sub>	0,018 mg
Glifosato	0,500
Cicloheximida	0,100

pH: 6,8

Referencia bibliográfica:

Radosevich, M., Traina, S. J., Hao, Y. L., and Tuovinen, O. H. (1995). Degradation and mineralization of atrazine by a soil bacterial isolate. Appl. Environ. Microbiol. 61, 297–302.

#### S4.1.2 Medio R2A

Compuesto	Cantidad (g L <sup>-1</sup> )
Extracto de levadura	0,5
Peptona	0,5
Caseína hidrolizada	0,5
Glucosa	0,5
Almidón	0,5
K <sub>2</sub> H(PO <sub>4</sub> )	0,3
MgSO <sub>4</sub>	0,024
Piruvato de sodio	0,3
Agar	15,0

pH: 7,2 ± 0,2

Referencia bibliográfica:

Reasoner, D. J., and Geldreich, E. E. (1985). A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. Appl. Environ. Microbiol. 49, 1–7.

---

## **Capítulo 5 - Identificación, caracterización y análisis genómico de microorganismos tolerantes a glifosato**

---

## 5.1 Introducción

La rizorremediación (o fitorremediación asistida por microorganismos) implica la degradación del xenobiótico por los microorganismos nativos asociados a la raíz en un tiempo razonable, proceso que resultará exitoso en función de la capacidad que tengan estos microorganismos para tal fin. En la rizorremediación de glifosato, esto es particularmente importante por dos razones que, aunque ya han sido presentadas, vale la pena volver a mencionar: (1) El glifosato no es degradado en el tejido vegetal y (2) su baja hidrofobicidad hace dificultoso su pasaje a través de las membranas celulares en el tejido de raíz. Como fue discutido en el capítulo 4, si bien existe la posibilidad que *L. corniculatus* “gladiador” establezca naturalmente un ambiente rizosférico capaz de degradar el glifosato, la inoculación previa de la semilla con una bacteria tolerante y degradadora, capaz de establecerse en la rizosfera, aumentaría la posibilidad de constituir un sistema de rizorremediación exitoso (Kuiper et al., 2004; Gerhardt et al., 2017). Entonces, la búsqueda de una cepa adecuada no solamente debería basarse en el hallazgo de capacidades adecuadas de degradación y tolerancia a glifosato, sino también en la capacidad de establecerse a lo largo del tiempo en la raíz de *L. corniculatus*. Para ello, en la caracterización genética y bioquímica propuesta para los microorganismos aislados, se incluye la exploración de diversas habilidades o capacidades de promoción de crecimiento vegetal, con la intención de que esta o estas características diferenciales representen un beneficio para la especie vegetal. La caracterización de la posible interacción planta-microorganismo permite, por otro lado, ampliar la estrategia a futuro, ya que una vez identificada y reconocidos sus mecanismos de promoción de crecimiento, puede ensayarse su inoculación en otras especies vegetales.

Por último, disponer de un banco de cepas tolerantes y degradadoras de glifosato representa también una ventaja en términos de potencial biotecnológico, ya que permitiría ampliar su utilización a diferentes procesos de remediación de glifosato. En este sentido, la secuenciación del genoma completo de las especies degradadoras que presenten mayor interés, permitiría comprender futuros alcances dentro de los procesos y evaluar otros aspectos asociados, como la producción de enzimas específicas o biomoléculas de interés comercial.

### 5.1.1 Bacterias tolerantes a glifosato

Como ya se ha presentado previamente, la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS, EC2.5.1.19), llamada también *aroA*, es el único blanco molecular del glifosato.



Desde que Steinrücken y Amrhein en 1980 descubrieron que la EPSP sintasa es el blanco molecular del glifosato (Steinrücken & Amrhein, 1980), se han llevado a cabo múltiples estudios estructurales y funcionales sobre esta enzima. En base a la sensibilidad intrínseca que presentan las EPSP sintasas de diferentes organismos, se las dividió en dos tipos o “Clases”. Las enzimas de Clase I son aquellas que están presentes en las plantas y en muchas bacterias Gram negativas, y conforman la clase más sensible a glifosato, representada generalmente por la EPSPS de *E. coli*. Las enzimas Clase II son aquellas que pueden ser halladas en bacterias tolerantes como *Agrobacterium sp.* CP4, y poseen una alta eficiencia catalítica aún frente a grandes concentraciones de glifosato, además de una importante diferencia en su secuencia peptídica respecto a las enzimas Clase I (Pollegioni et al., 2011).

Mutaciones puntuales en la secuencia de la enzima, como la sustitución P101S (*S. typhimurium*) o G96A (*K. pneumoniae*), fueron descritas como responsables de otorgar tolerancia al herbicida. Las mutaciones en G96 ocasionan una pérdida de afinidad por el sustrato natural, el fosfoenolpiruvato, mientras que las mutaciones en P101, aunque confieren una menor tolerancia que las de G96, permiten una adecuada eficiencia catalítica. También se reportaron enzimas que poseen dos sitios de mutación, la EPSPS G101A/G137D y G101A/P158S en la especie vegetal *Petunia hybrida*, la EPSPS G96A/A183T de *E. coli* y la EPSPS T102I/P106S en *Zea mays*. Esta última, llamada comúnmente “TIPS”, es estructuralmente una enzima Clase I, pero con características cinéticas y de tolerancia similares a las Clase II, razón por la cual es actualmente utilizada en eventos de maíz transgénicos.

Algunos ejemplos de enzimas Clase I son, además de las mencionadas anteriormente, las presentes en *Aeromonas salmonicida* y *Arabidopsis thaliana*, mientras que ejemplos de Clase II son las presentes en *Pseudomonas sp. strain PG2982*, *Bacillus subtilis*, *Ochrobactrum anthropi* y *Staphylococcus aureus* (Yi et al., 2016).

En los últimos años, se describió una acetiltransferasa con aceptable afinidad por la molécula de N-(fosfonometil)-glicina, la glifosato acetiltransferasa o GAT, cuyo sustrato es convertido a N-acetil glifosato. Una vez acetilado, es despojado de su acción inhibidora sobre la EPSP sintasa. Por tal motivo (y por no degradar al glifosato como las enzimas involucradas en el siguiente punto), es considerada un mecanismo de resistencia alternativo. Tres variantes de la enzima fueron descubiertas en *B. licheniformis* (Castle, 2004; Siehl et al., 2007), y se está trabajando para mejorar sus propiedades cinéticas para ser utilizada como mecanismo de detoxificación a glifosato en eventos transgénicos dobles (Guo et al., 2015).

### 5.1.2 Bacterias que degradan glifosato

El glifosato, como se describió en el capítulo de antecedentes, es miembro de una gran familia de compuestos, los ácidos fosfónicos o fosfonatos, caracterizados por poseer el enlace químicamente estable carbono-fósforo (C-P). Así, su degradación se da en bacterias a partir de dos rutas metabólicas distintas, que llamaremos la vía del AMPA (ácido aminometilfosfónico) y la vía de la sarcosina. La primera involucra la acción de una oxidorreductasa (llamada glifosato oxidorreductasa o GOX) o también una glicina oxidasa, que producen AMPA y glioxilato como productos de degradación. La segunda involucra la participación de fosfonatasas específicas, C-P liasas, dando origen a los productos de degradación sarcosina y fosfato inorgánico.

La oxidorreductasa GOX (EC 1.14.14.1) fue descrita por primera vez en *O. antrophi* GPK 3 (Ermakova et al., 2008). Una vez oxidada la molécula de glifosato por esta enzima, el glioxilato es fácilmente incorporado al metabolismo celular, mientras que el AMPA (un fosfonato) puede ser transportado al espacio extracelular o bien metabolizado por C-P liasas específicas para dar metilamina y fosfato. En otros casos, puede ocurrir que el AMPA sufra una transaminación mediante una transaminasa dependiente de piruvato dando como productos, ácido formilfosfónico y amonio. La enzima glicina oxidasa (EC 1.4.3.19) también mostró la capacidad de metabolizar glifosato para dar AMPA, aunque el mecanismo parecería ser distinto al de la GOX (Zhan et al., 2013). Algunas bacterias reportadas con la capacidad de metabolizar el glifosato por la vía del AMPA son: *Achromobacter* sp., *Athrobacter atrocyaneus*, *Flavobacterium* sp., *Geobacillus caldoxylosilyticus*, *O. anthrophi*, *Pseudomonas pseudomallei* (Sviridov et al., 2015).

El uso de glifosato como fuente de fósforo implica que el microorganismo posee la capacidad enzimática para clivar el enlace C-P del compuesto. Esta función es llevada a cabo por la enzima C-P liasa, ampliamente distribuida en bacterias (Villarreal-Chiu et al., 2012), cuya actividad requiere la expresión de un total de 14 polipéptidos que se encuentran en el operón *phn*, *phnCDEFGHIJKLMNOP*. En la tabla 5.1 se describen las funciones de cada uno de los componentes peptídicos. El componente *phnCDE* es un transportador tipo ABC para fosfonatos, mientras que el componente *phnFGHIJKLMNOP* es el responsable de la transformación del fósforo del grupo fosfonato a 5'-fosforibosil 1'-difosfato (PRPP) y posterior mineralización (Hove-Jensen et al., 2014).

Entre los organismos que usan a glifosato como fuente de fósforo encontramos a: *Sinorhizobium meliloti*, *O. anthropi*, *Agrobacterium radiobacter*, *Burkholderia pseudomallei*, *Nostoc* sp. PCC7120, *Achromobacter* MPS 12A, *Alcaligenes* sp. GL, *Pseudomonas* sp. ASW, *Pseudomonas* sp. GLC11, *Pseudomonas* sp. PG2982, *Rhizobium meliloti* 1021, *Streptomyces* sp. StC.

**Tabla 5.1.** Descripción de los polipéptidos del operón *phn*. El número de acceso de NCBI es el que indica la secuencia utilizada en la búsqueda de homólogos en los genomas secuenciados.

Polipéptido Phn	Actividad y/o función	Número de acceso en NCBI
PhnC	Transportadores de tipo ABC, proteína de unión a nucleótidos	NP_418530.1
PhnD	Transportadores de tipo ABC, proteína de unión a periplasma	NP_418529.1
PhnE	Transportadores de tipo ABC, proteína de unión a membrana	NC_000913.3
PhnF	Péptido regulatorio	NP_418526.1
PhnG	Componente purina ribonucleósido trifosfato fosfonilasa del complejo PhnGHIJK	NP_418525.1
PhnH	Componente purina ribonucleósido trifosfato fosfonilasa del complejo PhnGHIJK	NP_418524.1
PhnI	Componente purina ribonucleósido trifosfato fosfonilasa del complejo PhnGHIJK	NP_418523.1
PhnJ	Componente C-P liasa del complejo PhnGHIJK	NP_418522.1
PhnK	Proteína accesoria del complejo PhnGHIJK, proteína de unión a nucleótidos de un transportador tipo ABC	YP_026282.1
PhnL	Componente purina ribonucleósido trifosfato fosfonilasa o proteína de unión a nucleótido de transportador tipo ABC	NP_418520.1
PhnM	5'-trifosforibosil 1'-fosfonato difosfohidrolasa	NP_418519.1
PhnN	Ribosil difosfato fosfoquinasa	NP_418518.1
PhnO	Aminoalquilfosfonato N-acetyltransferasa	NP_418517.1
PhnP	Fosforribosil fosfodiesterasa cíclica	NP_418516.1

### 5.1.3 Bacterias con capacidad de promoción de crecimiento vegetal

Los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal expresados por los microorganismos pueden ser directos, como cuando facilitan la disponibilidad de un determinado nutriente o modulan las concentraciones hormonas vegetales, o indirectos, inhibiendo la acción de agentes patógenos o la sensibilidad a diferentes tipos de estrés (Glick, 2012).

Los mecanismos directos comprenden una serie de procesos moleculares en la rizosfera y en la endosfera, cuya finalidad es la de facilitar a la especie vegetal la captación de diferentes nutrientes que muchas veces se encuentran en concentraciones subóptimas, no biodisponibles o el propio ambiente contaminado imposibilita su captación.

Tal vez la habilidad más ampliamente explorada es la fijación biológica de nitrógeno. Las plantas son capaces de incorporar nitrógeno en forma de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) o nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), pero no a partir de  $\text{N}_2$  atmosférico. Cierta grupo de microorganismos, llamado diazótrofos, puede fijar el nitrógeno atmosférico y transformarlo en amonio para que de esta forma sea incorporado a la planta. Este proceso es realizado mediante nitrogenasas codificadas en el complejo de genes *nif*, un conjunto de siete operones distintos que codifican a 20 proteínas en un locus de 20–24 kb. Las bacterias

diazótrofas pueden formar asociaciones simbióticas donde se desarrolla la fijación de nitrógeno, en órganos específicos formados por la bacteria y la planta llamados nódulos, o bien pueden encontrarse en forma libre en la rizosfera. Entre las bacterias fijadoras podemos encontrar a los géneros *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azotobacter*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Allorhizobium*, entre otros.

La mayoría del fósforo en el suelo, nutriente necesario para el desarrollo de la planta, se encuentra en forma insoluble, es decir, no biodisponible. Es por ello que es de gran interés la capacidad que poseen ciertos microorganismos para solubilizar fósforo, haciéndolo biodisponible para la planta. En el suelo, podemos encontrar al fósforo en su forma inorgánica, generalmente como apatita o fosfatos de calcio, o diversas formas orgánicas, como inositol fosfato (fitatos) y ésteres de fosfato. Los mecanismos involucrados en la solubilización de fosfatos en la forma inorgánica ocurren mediante el descenso del pH, la secreción de moléculas quelantes, la formación de complejos solubles de metales, desplazamiento de aquellos insolubles (con calcio, aluminio, hierro, etc.) y secreción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular como el ácido glucónico y el 2-cetoglucónico. En cuanto a aquellos involucrados en la solubilización de fosfatos orgánicos, encontramos a las fosfatasas ácidas, fitasas, fosfonatasas y C-P liasas (Sharma et al., 2013; Oteino et al., 2015). Entre las especies bacterianas comúnmente asociadas con esta actividad encontramos a *Alcaligenes* sp., *Aerobacter aerogenes*, *Achromobacter* sp., *Actinomadura oligospora*, *Agrobacterium* sp., *Azospirillum brasilense*, distintas especies de *Bacillus*, *Bradyrhizobium* sp., *Brevibacterium* sp., *Citrobacter* sp., distintas especies de *Pseudomonas*, *Erwinia* sp., *Micrococcus* sp., *Enterobacter asburiae*, *Serratia phosphoticum*, *Nitrobacter* sp., *Thiobacillus ferrooxidans*, *T. thiooxidans*, *Rhizobium meliloti*, *Xanthomonas* sp. (Sharma et al., 2013).

El hierro es otro elemento que, aunque es muy abundante en la pedosfera, se encuentra poco biodisponible tanto para los microorganismos como para la planta. Es por ello que ciertas bacterias desarrollaron la habilidad de producir moléculas de bajo peso molecular, llamadas sideróforos, que, junto con transportadores adecuados, contribuyen a producir un aumento de la concentración celular de hierro. La secreción de estas moléculas es también aprovechada por la planta, que capta el mineral por la vía radicular. Existen una vasta cantidad de sideróforos, aunque no todos están identificados (Hider & Kong, 2010). En general, se pueden clasificar en 4 grupos, en función del tipo de ligando de unión al hierro: hidroximatos, catecolatos,  $\alpha$ -hidroxicarboxilatos y ligandos mixtos (Zawadzka et al., 2006; Barry & Challis, 2009).

La modulación de los niveles de fitohormonas es otro efecto promotor del crecimiento que los microorganismos habitualmente producen sobre especies vegetales. Las fitohormonas tienen una

importancia fundamental en el desarrollo de la estructura radicular. Es por eso que incrementando o disminuyendo localmente sus concentraciones, los microorganismos pueden transformar la arquitectura de la raíz. Podemos encontrar que gran variedad de bacterias asociadas a plantas son capaces de sintetizar fitohormonas como auxinas, ácido abscísico, citoquininas y giberelinas, a la vez que también producen compuestos orgánicos volátiles (VOC, por sus siglas en inglés) y modulan enzimáticamente la concentración del etileno.

La auxina por excelencia es el ácido indolacético (IAA, por sus siglas en inglés). El IAA afecta la división celular, extensión y diferenciación en tejidos, aumentan la tasa de crecimiento del xilema y de la raíz, controla el crecimiento vegetativo, está involucrado en la iniciación del desarrollo de las raíces laterales y adventicias, media la respuesta a luz y fotosíntesis, formación de pigmentos, biosíntesis de varios metabolitos y desarrollo de la nodulación, entre otras funciones. El crecimiento y acción en cada tejido es modulado por concentraciones específicas de la hormona. La resultante entre la producción exógena proveniente de los microorganismos y la producción endógena, será la responsable de los efectos en la raíz (Spaepen & Vanderleyden, 2011; Duca et al., 2014).

El ácido abscísico está relacionado con la respuesta de la planta a diferentes tipos de estrés, como anegamiento, sequía y frío; a la vez que inhibe la germinación y floración. Es producido por diversos microorganismos benéficos, como *A. brasilense* y *B. japonicum*. Las citoquininas están representadas por la zeatina, y tienen la capacidad de inducir la división celular en presencia de auxinas. Estimulan el desarrollo de raíz y tallo, dominancia apical y función del meristema del tallo, entre otras funciones. Entre las bacterias benéficas que producen citoquininas se encuentran los géneros *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas*, *Xantomonas*, *Serratia* y *Rhodospirillum* (de Garcia Salamone et al., 2006).

Las giberelinas son terpenoides, que conforman un grupo de alrededor de 130 tipos de moléculas diferentes, y sus efectos están asociados con la proliferación de la división y elongación del meristema subapical, teniendo un papel relevante en la elongación del internodo. *A. lipoferun*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *B. japonicum*, *Rhizobium* y *Xantomonas* son algunos microorganismos asociados a los efectos benéficos de esta hormona. Para citoquininas como el ácido abscísico y las giberelinas, no están claras aún las rutas biosintéticas en microorganismos.

Los compuestos volátiles, en especial la 3-hidroxi-2-butanona (acetoina) y el 2,3-butanodiol también son moduladores del estrés y desarrollo radicular. El mecanismo principal por el cual están involucrados en la promoción de crecimiento vegetal es el rol que tienen como reguladores de la síntesis de otras fitohormonas como citoquininas y el etileno, posiblemente por ello también cause

inhibición de crecimiento en ciertas condiciones (Bailly & Weisskopf, 2012; Tahir et al., 2017). Las rutas metabólicas para la biosíntesis de acetoína y 2,3-butanodiol involucran la vía de *Emden-Meyerhof-Parnas* (EMP), donde dos moléculas de piruvato forman una de  $\alpha$ -acetolactato, para ser luego decarboxilado y formar acetoína, pudiendo convertirse reversiblemente a 2,3-butanodiol.

El etileno, también una hormona volátil, conocido por tener la capacidad de inducir la maduración de frutos y senescencia de las flores. En la raíz, promueve su iniciación, inhibe la elongación de la raíz primaria y vellosidades, activa la síntesis de otras fitohormonas, inhibe la nodulación, la interacción planta-micorriza y está involucrado en la respuesta a estrés (Dugardeyn & Van Der Straeten, 2008). La respuesta al estrés es la función más conocida de este compuesto, incrementándose la producción frente a temperaturas extremas, alta exposición lumínica, anegamiento o sequía, compuestos tóxicos, radiación, daño mecánico, insectos, salinidad y patógenos como virus, hongos y bacterias. El etileno se sintetiza a partir de S-adenosil metionina, que se convierte a ácido 1-aminociclopropanocarboxílico (ACC) por la ACC-sintasa. La secreción de la enzima ACC-desaminasa por parte de los microorganismos promotores de crecimiento cliva este precursor. La depleción de esta molécula entonces conlleva a la inhibición del efecto inhibitorio característico de esta hormona (Glick, 2003; Glick 2014). Entre las especies bacterianas que poseen esta actividad enzimática, se encuentran *Alcaligenes* spp., *Bacillus* spp., *Bacillus pumilus*, *Burkholderia* sp., *B. phytofirmans*, *Enterobacter* spp., *E. cancerogenus*, *E. cloacae*, *Erwinia herbicola*, *Klebsiella* sp., *Kibdelosporangium phytohabitans*, *Micrococcus* sp., *Methylobacterium oryzae*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudoalteromonas maricaloris*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. thivervalensi*, *Rhodococcus* sp., *Serratia marcescens*, *Variovorax paradoxus* entre otras (Ahemad & Kibret, 2014).

Por otra parte, los mecanismos indirectos de promoción de crecimiento vegetal son aquellos que refieren al biocontrol ejercido por los microorganismos. Entre estos mecanismos se encuentran la síntesis de antibióticos (generalmente contra hongos) y enzimas (quitinasas, celulasas,  $\beta\beta$ -1,3 gluconasas, proteasas y lipasas), la producción de sideróforos, que limita la biodisponibilidad a patógenos, competición por los nutrientes, producción de ACC-desaminasa (disminuyendo la concentración de etileno y por ende evitando respuesta al estrés causada por el patógeno) y estimulación de la resistencia sistémica inducida (inducción de jasmonato y etileno, que activan también respuesta a defensa frente al patógeno) (Glick, 2012).

Durante esta etapa de trabajo se cumplieron los siguientes objetivos específicos:

4. Aislamiento y caracterización tanto fenotípica como genotípica de bacterias tolerantes y degradadoras de glifosato.
5. Evaluación de las capacidades promotoras del crecimiento de las plantas (PGP) de los microorganismos obtenidos en el punto 4.
7. Secuenciación del genoma de la o las cepas que presenten mayor interés mediante la plataforma ION TORRENT® y posterior análisis bioinformático.

## **5.2 Materiales y Métodos**

### **5.2.1 Control de viabilidad de las cepas almacenadas y determinación indirecta del uso del glifosato como nica fuente de fósforo**

Habiendo transcurrido tres meses desde el aislamiento, purificación y conservación de las cepas tolerantes en glicerol y en forma liofilizada, se realizó un control de su sobrevivencia y pureza como parte de los procedimientos necesarios para establecer un banco de cepas propio. Para ello, todas las cepas fueron re cultivadas en medios sólido y líquidos: LB (Bertani, 1951), R2A y MSB-Gly.

Las cepas que presentaron crecimiento en placa fueron periódicamente revisadas por el plazo de dos semanas para detectar posibles contaminaciones. A su vez, se corroboró que la morfología de las colonias sea consistente con aquellas observadas en las placas obtenidas en el punto 4.2.2.3.

Una vez establecida la pureza de las cepas, y para controlar que la única fuente de fósforo que aporta el medio de cultivo MSB-Gly provenga del glifosato y no de posibles fuentes espurias, se tomaron diferentes recaudos previos a la caracterización de las cepas. En primer lugar, se reemplazó el reactivo de glifosato grado técnico utilizado como sustrato durante los cultivos de enriquecimiento por uno de máxima pureza (>99%, Sigma Aldrich, Buenos Aires, Argentina). El segundo fue el de tomar 5 cultivos al azar y subcultivarlos repetidas veces en medio MSB sin glifosato ni otra fuente adicional de fósforo, para observar si el cultivo era capaz de mantener el crecimiento en ausencia de la fuente propuesta de fósforo, es decir, el glifosato. El tercero, fue medir las concentraciones de fosfato disponible en el medio de cultivo mediante la metodología tradicional propuesta por Murphy y Ripley (1962).

### **5.2.2 Identificación de cepas mediante secuenciación parcial del gen del ARNr 16s**

Se realizaron cultivos en MSB-Gly hasta alcanzar la fase estacionaria. Luego, 4 mL de cultivo fueron centrifugados y la biomasa obtenida en el pellet se resuspendió en 250 µL de solución buffer TEG (Tris-EDTA-Glucosa), junto con 5 µL de lisozima (300 mg mL<sup>-1</sup>), 5 µL de RNasa (20 mg mL<sup>-1</sup>) y 20 µL de proteasa (7500 U mL<sup>-1</sup>). La solución se incubó durante 30 minutos a 37 ± 1 °C. El ADN genómico total se extrajo utilizando el kit comercial Highway ADN PuriPrep-S (Inbio Highway®, Tandil, Argentina) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La amplificación del gen del ARNr 16s mediante PCR se realizó utilizando los primers bacterianos universales 27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y



1492r (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'). Las concentraciones finales de reactivos en la reacción fueron: Buffer de reacción 1X, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, dNTP-mix 200 µM, primers (fwd y rev) 0,3 µM, polimerasa T-Plus 1,5 U. Para 50 µL de reacción se usó 1 µL de ADN. El programa de PCR fue: 3 minutos iniciales a 94 °C, 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 60 segundos a 55 °C y 120 segundos a 72 °C, seguido de un paso de extensión final de 10 minutos a 72 °C. Los productos de amplificación fueron chequeados mediante electroforesis en gel de agarosa 1% y luego purificados con el kit Highway ADN PuriPrep-GP (Inbio Highway®, Tandil, Argentina) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La secuenciación de los fragmentos se realizó en la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología CNIA-INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Buenos Aires, Argentina) utilizando un secuenciador automático capilar modelo ABI3130XL (Applied Biosystems®, California, EE. UU.).

La asignación taxonómica más probable de cada uno de los aislamientos se obtuvo mediante la comparación de sus secuencias parciales del gen 16S rRNA (un promedio de 1350 pares de bases, que representan aproximadamente un 95% de cobertura del gen) contra secuencias homólogas de cepas procariotas utilizando el servidor EzTaxon en la base de datos EzBioCloud (Kim et al., 2007; Yoon et al., 2017) y el servidor del Ribosomal Database Project (RDP) (Cole et al., 2014).

### **5.2.3 Estudios in-vitro de capacidad de promoción del crecimiento vegetal**

#### **5.2.3.1 Actividad de ACC-desaminasa**

El método desarrollado por Belimov y colaboradores (2005) se usó para evaluar la producción de la ACC-desaminasa. Los cultivos se realizaron a partir de un inóculo de solución stock de glicerol de cada cepa en placas de 24 pocillos conteniendo 1,0 mL de medio líquido 869 (S5.1.1), e incubados durante 72 horas a 25 ± 1 °C sin agitación. Luego del cultivo se realizó una centrifugación a 3000 rpm durante 20 minutos y se eliminó el sobrenadante. Los pellets celulares se lavaron dos veces con 1,0 mL de MgSO<sub>4</sub> 10 mM y se resuspendieron en 0,5 mL de 10 mM MgSO<sub>4</sub>. Luego 250 µL de cada suspensión celular fueron inoculados sobre 1,2 mL de medio salino ACC-desaminasa (S5.1.2), que contiene ACC 5 mM como única fuente de nitrógeno. Los cultivos se incubaron durante 72 horas a 25 ± 1 °C en agitación de 100 rpm, se centrifugaron a 4000 rpm durante 15 minutos y se descartaron los sobrenadantes. Los pellets se volvieron a suspender en 100 µL de buffer Tris-HCl 0,1 M (pH 8,5) y se realizó una lisis celular mediante la adición de 3 µL de tolueno seguido de agitación vigorosa en vórtex durante 10 minutos. Se añadieron 10 µL de ACC 0,5 M y 100 µL de buffer de Tris-HCl 0,1 M (pH 8,5), y se incubó durante 30 minutos a 30 ± 1 °C bajo agitación a 150 rpm. Posteriormente, se añadieron a las suspensiones celulares 900 µL de HCl 0,56 N y 150 µL de reactivo de 2,4-dinitrofenilhidrazina al 0,2

%. La reacción transcurrió durante 30 minutos a  $30 \pm 1$  °C, y luego se detuvo por agregado de 700  $\mu$ L de NaOH 2N. Se usó un cultivo de cada cepa sin agregado de ACC como control. La cepa *Pantoea ananatis* GB1 (Gkorezis et al., 2016) se utilizó como control positivo. La presencia de  $\alpha$ -cetobutirato indica actividad ACC desaminasa, ya que se genera al hidrolizarse el ACC. La absorbancia del compuesto puede determinarse de forma cualitativa visualmente, por la formación de color amarillo (540 nm).

#### 5.2.3.2 Producción de ácido Indolacético

Se realizó un ensayo cualitativo para evaluar la producción de ácido indolacético (IAA) por las cepas, de acuerdo con lo propuesto por Patten y Glick (2002). Las cepas fueron cultivadas en placas de 24 pocillos conteniendo 1,0 mL de medio 869 diluido al 1/10 y suplementado con 500 mg L<sup>-1</sup> de triptófano a  $25 \pm 1$  °C durante 4 días y 150 rpm de agitación. Luego, el cultivo fue centrifugado a 3000 rpm durante 30 minutos y se extrajeron cuidadosamente con pipeta 0,5 mL del sobrenadante, teniendo especial cuidado de no tocar el pellet. El sobrenadante se colocó en un nuevo pocillo, se agregó 1,0 ml de reactivo de Salkowski modificado (98 ml de ácido perclórico al 35%, 2 mL de 0,5 M de FeCl<sub>3</sub>) y se dejó desarrollar la reacción a temperatura ambiente por 20 minutos. Las bacterias que producen IAA se identificaron por el desarrollo de un color rosado (535 nm) en la solución. La cepa *P. ananatis* GB1 (previamente informada como productora de IAA) se utilizó como control positivo. Se utilizó medio de reacción sin inocular como control negativo.

#### 5.2.3.3 Producción de acetoína

La producción de acetoína fue investigada utilizando la prueba de Voges-Proskauer, de acuerdo con las modificaciones de Romick y Fleming (1998). Las cepas se cultivaron en medio 869 durante 24 horas a  $25 \pm 1$  °C en placa de 24 pocillos. Luego, 20  $\mu$ L de cada cultivo fueron transferidos a una nueva placa de 24 pocillos conteniendo en cada uno de ellos 1,0 mL de medio MR-VP (S5.1.3). Después de un período de incubación de 24 horas a  $37 \pm 1$  °C y 180 rpm de agitación, se añadió en orden a cada pocillo, 10  $\mu$ L de solución de L-arginina (10 mg mL<sup>-1</sup>), 10  $\mu$ L de alfa-naftol (50 mg mL<sup>-1</sup> en etanol absoluto), y 25  $\mu$ L de KOH 40% p/v en agua destilada. Las muestras se expusieron al aire y se dejaron reposar durante 20 minutos. El desarrollo de un color rosado a rojo se consideró positivo, mientras que ningún cambio de color o desarrollo de un ligero color amarillo se consideró negativo.

#### 5.2.3.4 Solubilización de fósforo inorgánico

El ensayo se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito por Nautiyal (1999). Se realizaron cultivos de cada cepa en medio 869 hasta alcanzar la fase exponencial, luego se centrifugaron a 4000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente, para luego realizar 2 lavados del pellet con una solución  $\text{MgSO}_4$  10 mM. De esta suspensión, se inocularon 50  $\mu\text{L}$  en placas de Petri conteniendo medio de crecimiento de fosfato del Instituto Nacional de Investigación Botánica (NBRIP) (S5.1.4), que posee 5  $\text{g L}^{-1}$  de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  insoluble. Se incubaron las placas a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 2 semanas. El desarrollo de un halo claro alrededor de colonias fue indicativo de solubilización de fosfato. La cepa *P. ananatis* GB1 (reportada previamente como una cepa capaz de solubilizar fosfato) se usó como control positivo.

#### 5.2.3.5 Actividad de fitasa

La capacidad de mineralización de fitatos se estudió de acuerdo con el método propuesto por Jorquera y colaboradores (2008). Se realizaron cultivos de cada cepa en medio 869 hasta alcanzar la fase exponencial, luego se centrifugaron a 4000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente, para luego realizar 2 lavados del pellet con una solución  $\text{MgSO}_4$  10 mM. De esta suspensión, se inocularon 50  $\mu\text{L}$  en placas de Petri conteniendo medio para screening de fitatos (PSM) (S5.1.5), con 4  $\text{g L}^{-1}$  de fitato de sodio. Se incubó durante 10 días a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  y luego se observó la aparición de zonas claras alrededor de las colonias, indicando la solubilización de fitatos. La cepa *P. ananatis* GB1 (reportada previamente como una cepa capaz de mineralizar fitatos) se usó como control positivo.

#### 5.2.3.6 Producción de ácidos orgánicos

El procedimiento se llevó a cabo de acuerdo según lo propuesto por Cunningham y Kuiack (1992). Las cepas se incubaron en una placa de 24 pocillos conteniendo 2,0 mL de medio 869 a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 48 horas y agitación. Seguidamente, fueron centrifugados a 2000 rpm por 30 minutos a temperatura ambiente, y se realizaron 2 lavados del pellet con una solución  $\text{MgSO}_4$  10 mM. Se añadieron 20  $\mu\text{L}$  de suspensión celular a 800  $\mu\text{L}$  de medio triptona-sacarosa (ST) (S5.1.6) en una placa nueva, que fue incubada por 5 días a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  y 200 rpm de agitación. Transcurrido este tiempo, se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de Alizarina Roja S al 0,1%. Un cambio de color de rojo a amarillo se consideró positivo. *P. ananatis* GB1 (anteriormente reportada como una cepa capaz de producir ácidos

orgánicos) se usó como control positivo, y el medio ST se usó como control negativo. El indicador de pH Alizarina Roja S cambia de rojo a amarillo en un ambiente ácido. Las bacterias que pueden producir ácidos orgánicos causarán una acidificación en su medio, y éste se volverá amarillo como resultado.

#### 5.2.3.7 Producción de sideróforos

La evaluación cualitativa de producción de sideróforos se basó en el ensayo descrito por Schwyn y Neilands (1987). Cada cepa se incubó en placas de 96 pocillos por 5 días a  $25 \pm 1$  °C en tres medios líquidos 284 (S5.1.7) distintos, conteniendo 0  $\mu$ M, 0,25  $\mu$ M y 3,00  $\mu$ M de citrato de Fe (III). Transcurrida la incubación, se añadieron a cada pocillo 100  $\mu$ L de solución CAS, que contiene 60,5 mg L<sup>-1</sup> de Cromo Azurol S (CAS), 72,9 mg L<sup>-1</sup> de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HDTMA), 30,24 g L<sup>-1</sup> de piperazina-1,4-bis (ácido 2-etanosulfónico) (PIPES) y 1% de 1 mM FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O en 10 mM HCl. Después de 4 horas, se buscó en los pocillos un viraje de coloración de azul a púrpura (sideróforos del tipo catecol) o de azul a naranja/amarillo (sideróforos de tipo hidroxamato).

#### 5.2.4 Determinación de la concentración mínima inhibitoria de glifosato en agar

Con el objetivo de conocer la máxima concentración de glifosato que puede tolerar cada cepa aislada, seguimos la metodología propuesta por *The Clinical and Laboratory Standards Institute* para evaluación de respuesta frente a antimicrobianos (Cockerill et al., 2012). Para ello, se prepararon placas de Petri con medio sólido MSB-Gly con diferentes concentraciones de glifosato (>99%, Sigma Aldrich, Buenos Aires, Argentina). Las concentraciones ensayadas fueron: 0, 100, 500, 1.000, 2.000, 3.000, 5.000, 7.500 y 10.000 mg Kg<sup>-1</sup> y todas fueron preparadas en el día. Las cepas se cultivaron hasta alcanzar densidades celulares de entre 1 a  $2 \cdot 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>. Una vez alcanzada la densidad celular, se realizó una dilución 1/10 en solución 0,9% NaCl estéril, y se sembraron con micropipeta 2  $\mu$ L de suspensión en la superficie del agar, con una cantidad aproximada de  $1 \cdot 10^4$  UFC. Se realizaron 5 replicados de cada cepa para cada concentración. Las placas se incubaron a  $25 \pm 1$  °C durante 6 días y los puntos finales fueron determinados como la concentración en la cual se inhibió el crecimiento de la colonia en más de un 50% respecto al cultivo en la placa control (sin glifosato). Se utilizó una cepa de *E. coli* como control negativo.

#### 5.2.5 Estudios particulares en *Ochrobactrum* sp. P6BS-III y *Rhizobium* sp. P44RR-XXIV

#### 5.2.5.1 Curvas de crecimiento en sistemas de cultivo líquido agitados

Se realizaron cultivos aeróbicos en MSB-Gly a  $25 \pm 1$  °C y 200 rpm de ambas cepas, usando glifosato como única fuente de fósforo ( $50 \text{ mg Kg}^{-1}$ ). En total, se estudiaron 6 cultivos independientes de cada cepa, tomándose muestra alternativamente, de acuerdo con los requerimientos de cada determinación, a lo largo de 9 días. Se realizaron las siguientes determinaciones:

1. Densidad óptica a 600 nm. La determinación se realizó espectrofotométricamente.
2. Recuento de unidades formadoras de colonia por mililitro ( $\text{CFU mL}^{-1}$ ). Mediante técnica de microgota. Se sembraron 10  $\mu\text{L}$  de cada una de las diluciones seriadas del cultivo en placas de Petri conteniendo medio rico 869, y luego se llevaron a incubación por 3 días a  $25 \pm 1$  °C. El recuento se realizó en aquellas diluciones que presentaron entre 3 y 30 UFC.
3. Concentración remanente de glifosato en medio de cultivo. La determinación de glifosato se realizó de manera independiente en dos laboratorios. Muestras de los cultivos celulares se tomaron a tiempo inicial (0 horas) y a tiempo final (216 horas) por triplicado, conservando el sobrenadante a -20°C. Luego, submuestras de cada sobrenadante fueron enviadas al laboratorio de la doctora Bojana Spirovic Trifunovic de la Facultad de Agricultura de la Universidad de Belgrado, Serbia. En sus instalaciones, el glifosato se determinó mediante UPLC en tándem con espectrometría de masas. Se describe el protocolo utilizado brevemente: se transfirió una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  de la muestra a un tubo de centrífuga de 15,0 ml con 9,0 ml de agua y 1 mL de KOH 0,1 M, mezclando mediante vortex por 1 minuto. A continuación, se transfirió 1 mL de la mezcla a un nuevo tubo de plástico de 15 mL, añadiéndose 1,0 mL de solución buffer  $\text{H}_3\text{BO}_3$  pH: 9 con 0,5 mL de solución FMOc (Cloruro de fluorenilmetiloxycarbonilo, 10 mM en acetonitrilo). La muestra se mezcló en vortex durante 1 minuto y se dejó en la oscuridad durante toda la noche. La reacción de derivatización se detuvo mediante la adición de 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  2 % y 100  $\mu\text{L}$  de EDTA 0,1 M. Finalmente, la muestra se filtró utilizando filtro de celulosa y se colocó en un vial. La muestra se midió en un sistema HPLC de la serie Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, Santa Clara, EE. UU.) acoplado a un espectrómetro de masas 6460 TripleQuad (Agilent Technologies, Santa Clara, EE. UU.), equipado con una interfaz de ionización por electrospray configurada en polaridad negativa. La columna cromatográfica utilizada fue una Agilent Poroshell 120 EC-C18 ( $3.0 \times 50 \text{ mm}$ ,  $2.7 \mu\text{m}$ ), y la fase móvil utilizada fue constituida por dos solventes que fueron utilizados en gradiente (Solvente A: 90% solución 5 mM de  $\text{NH}_4\text{Ac}$  en  $\text{H}_2\text{O}$  / 10% 5 mM de  $\text{NH}_4\text{Ac}$  en metanol; Solvente B: 90% solución 5 mM de  $\text{NH}_4\text{Ac}$  en metanol / 10% 5 mM de  $\text{NH}_4\text{Ac}$  en  $\text{H}_2\text{O}$ ). Las

condiciones cromatográficas, así como los parámetros del espectrómetro de masa son reservadas por el laboratorio. Por otro lado, otra alícuota de 1,0 mL de las mismas muestras fue enviada a la compañía Groen Agro Control (Delft, Países Bajos) por duplicado, en donde se determinó glifosato también mediante cromatografía líquida en tándem con espectrometría de masa, y bajo protocolo reservado por el laboratorio.

#### 5.2.5.2 Caracterización bioquímica

Se realizó la caracterización bioquímica de las cepas *Ochrobactrum* sp. P6BS-III y *Rhizobium* sp. P44RR-XXIV utilizando las placas GN2 MicroPlate™ (Biolog, Hayward, EE. UU.). Estas placas suministran 95 test bioquímicos distintos para microorganismos Gram negativos. Se prepararon suspensiones celulares de las dos cepas, las cuales fueron inoculadas en fase exponencial temprana ( $DO_{600}$  de aprox. 0,05) en cada pocillo de la placa. Luego, las placas fueron incubadas a  $30 \pm 1$  °C, sin agitación y revisadas diariamente. Una vez que no se observaron más reacciones positivas, se midió la absorbancia de las placas con un lector de microplacas FLUOstar Omega (BMG Labtech, Isogen Life Sciences®, Temse, Bélgica). El viraje del medio de incoloro a púrpura indica la ocurrencia de respiración en el pocillo y por ende, la habilidad de la cepa para metabolizar o utilizar el sustrato presente.

#### 5.2.5.3 Secuenciación de genoma completo mediante la plataforma ION TORRENT®

El flujo de trabajo involucrado en el análisis de los dos genomas consistió en 5 pasos, de acuerdo con Edwards y Holt (2013), y que se mencionan a continuación :

- a. Extracción de ADN con una máxima calidad de pureza
- b. Secuenciación de ADN y ensamble de fragmentos en *contigs*
- c. Ordenamiento de *contigs*
- d. Anotación del genoma en distintas plataformas especializadas
- e. Estudios particulares sobre el genoma y análisis complementarios

La extracción total de ADN se realizó a partir de cultivos en la fase exponencial temprana de crecimiento, con el fin de obtener la mayor cantidad de copias de plásmidos. Las células se lisaron usando un buffer de lisis enzimático que contiene Tris-EDTA, Triton X-100 y lisozima (pH 8,0) durante 30 minutos a  $37 \pm 1$  °C. Luego se extrajo el ADN utilizando el kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Hilden,

Alemania) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Obteniéndose una concentración final de ADN de 82,3 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  para *Ochrobactrum* sp. P6BS-III y 30,9 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  para *Rhizobium* sp. P44RR-XXIV. Los indicadores de calidad estándar espectrofotométricos para ADN (relación 260 nm/280 nm y 260 nm/230 nm) fueron adecuados para ambas muestras. Los valores de concentración y los indicadores estándar de calidad se obtuvieron utilizando el espectrofotómetro UV-Vis NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific®, Wilmington, EE. UU.).

Se estudió además la presencia de diferentes estructuras genómicas utilizando el protocolo adaptado del trabajo de Ramírez-Bahena y colaboradores (2012), que consistió en mezclar un pellet de cada uno de los cultivos celulares con 20  $\mu\text{L}$  de una solución de lisis (lisozima 500 U  $\text{mL}^{-1}$ , ARNasa 3,15 U  $\text{mL}^{-1}$  y 13% de sacarosa en buffer TBE) e inmediatamente cargarlos en los pocillos de un gel de agarosa al 0,8% conteniendo dodecilsulfato de sodio (SDS) 0,75%. Las muestras se corrieron por sextuplicado durante 12 horas a 80 V.

La secuenciación de los genomas tuvo lugar en la Universidad Thomson Rivers, en Canadá, y fue realizada por Sofie Thijs y supervisada por el profesor Jonathan D. Van Hamme durante el mes de julio de 2016. En ensamble de los genomas fue realizado por Sofie Thijs y Jonathan D. Van Hamme. El ordenamiento de contigs, la anotación del genoma en distintas plataformas especializadas, los estudios particulares sobre el genoma y los análisis complementarios fueron realizados por Francisco Massot con la supervisión de Sofie Thijs.

Los adaptadores de secuenciación y los códigos de barras fueron añadidos al ADN libre de ARN utilizando el Ion Xpress Plus Fragment Library Kit (Life Technologies® Inc., Burlington, Canadá). Los fragmentos de ADN ligados al adaptador se seleccionaron por tamaño (480 pb) en un gel de agarosa E-Gel SizeSelect al 2%, y se usaron esferas Agencourt MAPure XP (Beckman Coulter®, Mississauga, Canadá) para su purificación. El factor de dilución para la biblioteca de ADN se determinó utilizando el kit Ion Library Quantitation (Life Technologies Inc., Carlsbad, EE. UU.) previa amplificación y enriquecimiento con el kit Ion PGM Hi-Q OT2 400, usando el sistema Ion OneTouch 2 (Life Technologies® Inc., Carlsbad, EE. UU.). Las esferas enriquecidas se cuantificaron utilizando un Kit de Control de Calidad Ion Sphere, y la secuenciación se realizó en un chip 316v2, con un kit de secuenciación Ion PGM Hi-Q View en un secuenciador IonTorrent PGM (Life Technologies Inc., Carlsbad, EE. UU.).

Cada uno de los fragmentos obtenidos fue ensamblado utilizando el algoritmo SPAdes versión 3.8.2 (Bankevich et al., 2012) (modo de cobertura uniforme; kmers 21, 33, 55, 77, 99). El software

Mauve (Rissman et al., 2009) fue utilizado para el reordenamiento de los *contigs* obtenidos, y a su vez para posteriores estudios de genómica comparativa.

La anotación de los genomas se realizó utilizando el sistema de anotación RAST (Aziz et al., 2008; Overbeek et al., 2014), NCBI Prokaryotic Genome Automatic Annotation Pipeline (PGAP) (Tatusova et al., 2016) y la plataforma MicroScope utilizando la herramienta Magnifying Genomes, MaGe (Vallenet et al., 2006).

Los grupos de genes ortólogos (COG) y la reconstrucción de las vías metabólicas se llevaron a cabo utilizando las herramientas *MaGe*, *KEGG*, *MetaCyc* y *BioCyc* (Caspi et al., 2016). Las rutas metabólicas de interés, como la relacionada con los genes que confieren tolerancia y permiten la degradación del glifosato, genes relacionados con el metabolismo de fosfato, así como aquellos genes involucrados en actividades de promoción del crecimiento vegetal fueron localizadas de este modo. Los homólogos se definieron en función de un valor de corte de *e-value* de  $<0,0001$ ,  $>20\%$  de cobertura del *query* y  $>50\%$  de similitud de secuencia. Se describieron también las características del genoma en función de las distintas propiedades asignables al conjunto de genes anotados: Los genes de agrupamiento interno (*clusters*) fueron asignados usando *CD-HIT Suite* v4.6.8 (Huang et al., 2010), la predicción de función se hizo con *EggNog* 4.5.1 (Huerta-Cepas et al., 2016), los asignación de dominios *Pfam* se hizo usando *HMMER* server (Finn et al., 2015), los genes conteniendo péptido señal fueron asignados usando *SignalP* 4.1 server (Petersen et al., 2011) y finalmente, la predicción de genes con hélices transmembrana fue realizada utilizando el *TMHMM Server* v.2.0 (Krogh et al., 2001).

Los estudios de genómica comparativa se llevaron a cabo utilizando el servidor web *JSpecies* (Richter et al., 2015) y el *Genome-to-Genome Distance Calculator* (Meier-Kolthoff et al., 2013). El algoritmo *Tetra Correlation Search* proporcionado por *JSpecies* se usó para una búsqueda rápida de aquellos genomas más similares, y luego se ejecutaron los métodos ANIm, ANIb y GGDC 2.1 para determinar si aquellos se corresponden con las cepas en estudio a nivel de especie.

El análisis genómico global de las 24 especies del género *Ochrobactrum* disponibles en la base de datos de genomas procariotas del NCBI hasta la fecha 06-10-2017 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse#!/prokaryotes/>) se realizó usando el software *Bacterial Pan Genome Analysis* (BPGA) (Chaudhari et al., 2016), que utiliza el algoritmo de agrupamiento Usearch (Edgar, 2010), con un cut-off de identidad del 50% para agrupamiento de secuencias. La anotación funcional de secuencias únicas obtenidas se realizó mediante *EggNog* 4.5.1. El *Blast Ring Image Generator* (BRIG) (Alikhan et al., 2011) se utilizó para generar el mapa circular de genomas que incluye todos los ORFs con asignaciones funcionales de COG, rRNA, tRNAs, contenido



de G+C y contenido GC (como sesgo del genoma) y para examinar las diferencias genotípicas entre *Ochrobactrum* sp. P6BS-III y miembros representativos del género *Ochrobactrum*.

El software PHASTER (Arndt et al., 2016) se utilizó para la búsqueda de fagos y profagos en ambos genomas.

## 5.3 Resultados y discusión

### 5.3.1 Identificación e investigación de las capacidades de promoción de crecimiento vegetal

La selección de microorganismos tolerantes y potencialmente degradadores de glifosato a partir de muestras de suelo y rizosfera, forma parte de una tecnología integrativa y compleja como es la rizorremediación, en donde no solo se pretende que éstos posean las capacidades anteriormente mencionadas, sino también que reúnan una serie de características que los hagan manipulables y aplicables para su uso tanto a escala de laboratorio como en desarrollos y aplicaciones a gran escala. Entre esas características se encuentra la estabilidad frente al almacenamiento y conservación. Por ello, antes de comenzar con los distintos estudios de caracterización de las cepas, se evaluó la supervivencia de cada uno de los aislamientos luego de tres meses de conservación en frío y bajo forma liofilizada.

De un total de 24 cepas almacenadas en un principio, 16 volvieron a presentar crecimiento una vez cultivadas. En medio líquido se confirmó que los cultivos desarrollaran un crecimiento similar al registrado previo al almacenamiento, mientras que en medio sólido se verificó la preservación de la morfología de la colonia por comparación con placas conservadas en cámara fría y fotografías tomadas durante el aislamiento. Los 16 cultivos coincidieron en dichas características, por lo que se continuó trabajando con la totalidad de estas cepas.

A continuación, se evaluó el crecimiento en medio líquido MSB sin glifosato ni fuente alguna de fósforo de cinco cepas elegidas al azar, que fue comparado con los mismos cultivos en MSB-Gly. En la figura 5.1 se muestran las curvas de crecimiento para las cinco cepas elegidas luego del tercer subcultivo.

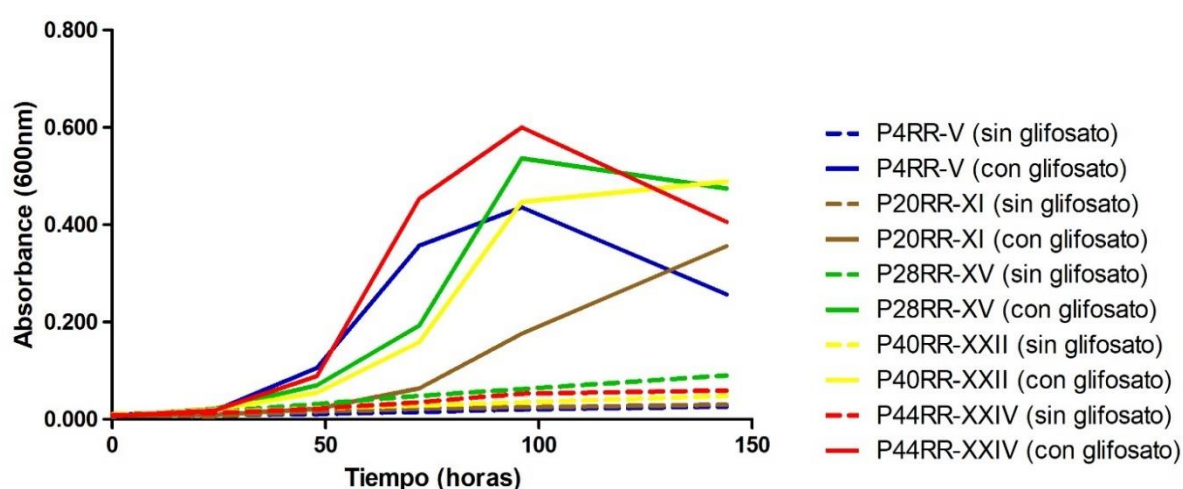
Luego de 24 horas de comenzado los cultivos, aquellos realizados en MSB-Gly superan la fase *lag* y comienzan la fase exponencial hasta alcanzar picos máximos de crecimiento alrededor de las 96 horas, mientras que los cultivos en MSB sin fuente alguna de fósforo no entran en la fase exponencial, mostrando un crecimiento muy inferior a aquellos suplementados con glifosato.

Durante el primer y segundo cultivo se pudo observar crecimiento apreciable en las cepas en MSB sin glifosato (Información no suministrada). Esto se debe a que posiblemente las cepas conservan un stock de fósforo intracelular, el cual debe ser depletado previo a evaluar efectivamente la influencia en la disponibilidad de fósforo. La estrategia de depleción del pool de fósforo intracelular fue utilizada

por Sushkova y colaboradores (Shushkova et al., 2012) con el objetivo de almacenar biomasa celular con capacidad degradativa activa. Por otro lado, también existen reportes sobre ciertas cepas que pueden almacenar glifosato intracelularmente (Liu et al., 1991).

Habiéndose reemplazado a su vez el glifosato de grado técnico por uno de calidad superior (>99% de pureza), se puede entonces suponer que no existen fuentes alternativas de fósforo, que provengan del medio de cultivo (trazas provenientes en las sales que lo componen) ni como parte del propio glifosato utilizado (subproductos provenientes de la síntesis, como AMPA, y otros fosfonatos).

Para confirmar la ausencia de fósforo soluble, se determinó su presencia espectrofotométricamente en el medio de cultivo. Ningún resultado fue superior al límite de cuantificación de la técnica ( $0,05 \text{ mg Kg}^{-1}$ ), por lo que crecimiento observado en MSB-Gly no podría ser estequiométricamente posible a estas concentraciones, consideramos una fórmula elemental de bacteria como C:N:P 45:9:1 (mol a mol) (Heldal et al., 1997) y los valores de C y N aportados por el



**Figura 5.1.** Curvas de crecimiento de microorganismos degradadores en presencia de glifosato (líneas continuas) y en ausencia de glifosato (líneas punteadas) durante el tercer subcultivo.

MSB.

La identificación de las cepas se realizó mediante la amplificación parcial, secuenciación y posterior análisis bioinformático del fragmento del gen del ARNr 16s. Los resultados se muestran en la tabla 5.2.

**Tabla 5.2.** Características culturales, tinción de Gram, identidad más probable y registro en GenBank de los aislamientos tolerantes y degradadores de glifosato

Origen de la cepa	Cepa	Características culturales	Tinción de Gram	Vecino más cercano (type strain)	Identidad	Cobertura	Número de acceso GenBank
Rizosfera-rizopiana de <i>L. tenuis</i>	P8RR - IV	Blanca, mucosa	-	<i>Rhizobium vallis</i> CCBAU 65647	99,56	96,4	MG786743
	P4RR - V	Blanca, mucosa	-	<i>Rhizobium mayense</i> CCGE526	100,0	68,3	MG786744
	P12RR - VI	Blanca, mucosa	-	<i>Rhizobium vallis</i> CCBAU 65647	99,41	96,4	MG786745
	P16RR - IX	Blanca, mucosa	-	<i>Rhizobium vallis</i> CCBAU 65647	99,56	96,2	MG786746
	P20RR - XI	Blanca, mucosa	-	<i>Rhizobium vallis</i> CCBAU 65647	99,52	88,9	MG786747
	P20RR - XII	Pálida, mucosa	-	<i>Ochrobactrum anthropi</i> ATCC 49188	100,0	95,5	MG786748
	P28RR - XV	Blanca, mucosa	-	<i>Rhizobium miluonense</i> HAMBI 2971	100,0	96,4	MG786749
	P32RR - XVIII	Blanca, mucosa	-	<i>Rhizobium vallis</i> CCBAU 65647	99,56	96,2	MG786750
	P40RR - XXII	Blanca, mucosa, borde irregular	-	<i>Rhizobium miluonense</i> HAMBI 2971	100	95,2	MG786751
	P44RR - XXIV	Blanca, centro crema y mucosa	-	<i>Rhizobium lusitanum</i> P1-7	99,85	96,2	MG786752
Suelos	P6BS - III	Blanca, mucosa	-	<i>Ochrobactrum haematophilum</i> CCUG 38531	99,78	96,4	MG786722
	P14BS - VII	Blanca, mucosa	-	<i>Rhizobium miluonense</i> CCBAU 41251	100,0	96,2	MG786723
	P26BS - XIV	Transparente, borde irregular	-	<i>Pedobacter nutrimenti</i> J22	98,65	92,5	MG786724
	P30BS - XVII	Transparente, mucosa	-	<i>Phyllobacterium myrsinacearum</i> IAM 13584	99,01	93,9	MG786725
	P38BS - XIX	Blanca, mucosa	-	<i>Rhizobium freirei</i> PRF 81	98,89	96,2	MG786726
	P38BS - XX	Blanca, bordes irregulares	-	<i>Ochrobactrum anthropi</i> ATCC 49188	100,0	96,4	MG786727

La selectividad del proceso de aislamiento llama sin dudas la atención. Mientras que en otros aislamientos con medios salinos suelen obtenerse cepas de origen filogenéticamente diverso (Cuadrado, 2009), aquí, casi la totalidad, a excepción de la *Sphingobacteriia Pedobacter* sp. P26BS-XIV, pertenece a la clase *Alphaproteobacteria*. Si tenemos en cuenta que se utilizó una fuente de carbono y energía simple como es la glucosa, una temperatura de 25°C para la obtención de microorganismos mesófilos y muestras provenientes de distintas matrices, podríamos atribuir esta selectividad al uso de glifosato como fuente única de fósforo.

Si bien, como se discutió en la introducción de este capítulo, existen registros de tolerancia a glifosato en bacterias taxonómicamente muy distantes entre sí, la capacidad de utilización de glifosato como fuente de fósforo, es decir, portar una C-P liasa específica para este fosfonato, parecería ser un recurso menos frecuente en los microorganismos. Lo anterior coincide con lo expuesto por Hove-Jensen en su revisión bibliográfica (Hove-Jensen et al., 2014). De hecho, para la vía de la sarcosina, el autor menciona a *O. anthropi*, *S. meliloti*, *A. radiobacter*, *B. pseudomallei* y *Nostoc* sp. como especies degradadoras, microorganismos muy cercanos taxonómicamente a los aislados. Destaca también como observación del proceso de aislamiento que, ni *Pseudomonas* ni *Burkholderia*, géneros observados con frecuencia en aislamientos de suelo y rizosfera, y que han sido reportados como degradadores de glifosato por la vía de la sarcosina, hayan sido aislados.

En ensayos de degradación realizados en comunidades (Forlani et al., 1999), se observa que la vía preferencial de degradación de glifosato en suelo ocurre por medio del intermediario AMPA y no por el de sarcosina. El enlace C-P del fosfonato es mucho más estable que el enlace C-O, aunque la

tendencia de una vía respecto a la otra no podría ser explicado por esto, ya que el complejo C-P liasa está ampliamente distribuido en bacterias, sino más bien por el hecho de que el glifosato es un fosfonato sintético (Ternan et al., 1998) lo que hace mucho más específica su degradación. En futuros ensayos sobre comunidades microbianas expuestas a glifosato, por ejemplo, estudiar la presencia del operón C-P liasa podría ser una herramienta potente. Es importante entonces tener en cuenta la especificidad de dicho operón.

A partir del procedimiento de asilamiento realizado en el capítulo 4, se encontró mayoritariamente 1 morfotipo cultural dominante por aislamiento, a excepción de los aislamientos P20RR y P38BS, en donde pudieron distinguirse dos colonias de características diferenciadas. Se puede ver que para estos dos casos (tanto en suelo como en rizosfera-rizoplana), las combinaciones fueron de *Rhizobium* spp. y *Ochrobactrum* spp..

En aislamientos en la rizosfera-rizoplana, la totalidad de las especies (a excepción de la combinación P20RR anteriormente mencionada) corresponden al género *Rhizobium*, mientras que en los aislamientos de suelo podemos identificar mayor cantidad de especies, aunque el número de microorganismos obtenido no permite arribar a ninguna conclusión acerca de la diversidad en este caso.

Históricamente, el orden de las *Rhizobiales* ha sido extensiva y exhaustivamente estudiado por presentar especies capaces de realizar fijación biológica del nitrógeno a partir de formar simbiosis específica con leguminosas, pero también por presentar diferentes capacidades de promoción de crecimiento vegetal. Se demostró que existe una relación directa entre la capacidad de formación de nódulos y el desarrollo y la productividad de la especie vegetal inoculada. Es así como el primer inoculante (bio-inoculante) registrado se constituyó a partir de una especie de este orden (Bashan, 1998). Un gran espectro de rizobios puede establecer simbiosis con diferentes especies vegetales (Cooper et al, 2008), pudiéndose ensayar en un futuro interacciones planta-microorganismo que trasciendan el género *Lotus*, propuesto para esta estrategia de rizorremediación, y avanzar sobre otras especies que también sean evaluadas y clasificadas como tolerantes, incrementando la versatilidad de esta metodología. Del total de especies de *Rhizobium*, 5 de ellas poseen como vecino más cercano a la *type strain* *R. vallis* CCBAU 65647, independientemente de que las muestras de las que provienen sean de orígenes distintos (distinto manejo agronómico, distinto tipo de suelo).

Esto posiblemente se deba a que la especie vegetal podría tener algún tipo de selección respecto a la especie de *Rhizobium* que coloniza la raíz. También podría pensarse que *R. vallis* tiene una tolerancia o capacidad degradativa que destaca por sobre las demás especies de *Rhizobium*.

Especies de *Ochrobactrum* fueron previamente caracterizadas tanto como tolerantes como degradadoras. Este género, aunque menos conocido que *Rhizobium*, ha sido aislado en diversos hábitats, entre los que se incluyen raíces de especies vegetales (Aujoulat et al., 2014). En los últimos años está siendo investigado tanto por su habilidad de promover el crecimiento vegetal, como por su capacidad de degradar distintos xenobióticos (Faisal, 2013; De Las Nieves Rodríguez Mendoza et al., 2013; Abraham & Silambarasan, 2016).

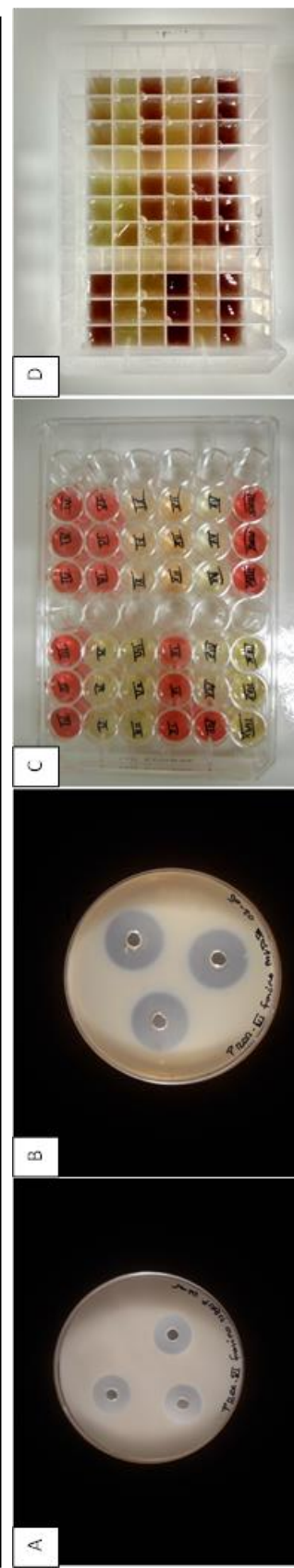
*Phyllobacterium* es un género que también está íntimamente ligado al entorno rizosférico, inclusive el de *L. corniculatus* (Valverde et al., 2005; Mantelin et al., 2006; Sánchez et al., 2014).

*Pedobacter* en cambio es un género que está asociado a suelos y ambientes de climas fríos. *P. nutrimenti* fue descrito por primera vez en el año 2014 a partir de un alimento congelado, durante el estudio de microorganismos adaptados al frío y su relación con la contaminación de alimentos (Derichs et al., 2014).

Luego de la identificación, se llevó a cabo el estudio de las capacidades de promoción de crecimiento vegetal en todas las cepas mediante el uso de test *in-vitro*. Los resultados mostraron un gran número de test positivos, destacándose la producción de AIA, los dos tipos de solubilizaciones de fosfato estudiadas (mineral y fitato) y la producción de sideróforos (Tabla 5.3). Los bajos niveles de fósforo en suelo en los lotes muestreados (y en la región de la Pampa deprimida en general) podrían explicar la prácticamente ubiquidad de la capacidad de solubilización de fósforo. El análisis de las distintas cepas de *R. vallis* muestra diferencias fenotípicas en algunas de ellas. Por ejemplo, P16RR-IX es la única productora de acetoína y de sideróforos, mientras que P12RR-VI posee una capacidad de solubilización de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  muy superior al resto. Este tipo de observaciones han sido reportadas previamente (Duan et al., 2009; Dinesh et al., 2015; Karnwal, 2017). En muchos trabajos en donde microorganismos con actividad de promoción de crecimiento vegetal son investigados no se identifican filogenéticamente las cepas, nombrándolas simplemente por el código de aislamiento. Fenómenos como los recién mencionados motivan a que la identificación filogenética de los microorganismos sea realizada en las caracterizaciones, a modo de enriquecer el perfil fenotípico de la especie.

**Tabla 5.3.** Resultado de los ensayos de promoción de crecimiento vegetal *in-vitro* realizados en los microorganismos aislados.

Origen de la cepa	Cepa	Capacidad de promoción de crecimiento vegetal <i>in vitro</i>						
		ACC-desaminasa	AIA	Acetoina	Solubilización de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Mineralización de fitatos	Producción de ácidos orgánicos	Producción de sideróforos
Rizosfera-rizoplana de <i>L. tenuis</i>	P8RR - IV	-	+	-	+	++	-	-
	P4RR - V	+	-	-	+	++	-	+
	P12RR - VI	-	+	-	+++	+++	-	-
	P16RR - IX	-	+	+	+	+	-	+
	P20RR - XI	-	+	-	+	+	-	-
	P20RR - XII	+	+	-	++	+	+	+
	P28RR - XV	+	-	+	+	++	-	+
	P32RR - XVIII	-	+	-	+	+	-	-
	P40RR - XXII	+	+	-	+	+	-	+
	P44RR - XXIV	+	+	+	-	++	+	+
	P6BS - III	-	+	-	++	+++	+	+
	P14BS - VII	-	-	-	+	++	-	+
Suelos	P26BS - XIV	+	-	+	+	++	-	+
	P30BS - XVII	-	+	+	+++	+++	+	+
	P38BS - XIX	-	+	-	-	++	+	+
	P38BS - XX	+	+	+	-	-	+	+



**Figura 5.2.** Imágenes de distintos test de promoción de crecimiento vegetal. A: solubilización de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . B: Solubilización de fitatos. C: Placa donde se llevó a cabo el test de producción de AIA (los pocillos color rosa indican positividad de la reacción). D: Placa donde se llevó a cabo el test de actividad ACC-desaminasa (los pocillos amarillos indican positividad de la reacción).

### 5.3.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de glifosato en agar

Con el objetivo de caracterizar el nivel máximo de tolerancia a glifosato en las cepas, se desarrolló un ensayo de cultivo en placa en donde se observó el desarrollo de las colonias aisladas sometidas a concentraciones crecientes de glifosato.

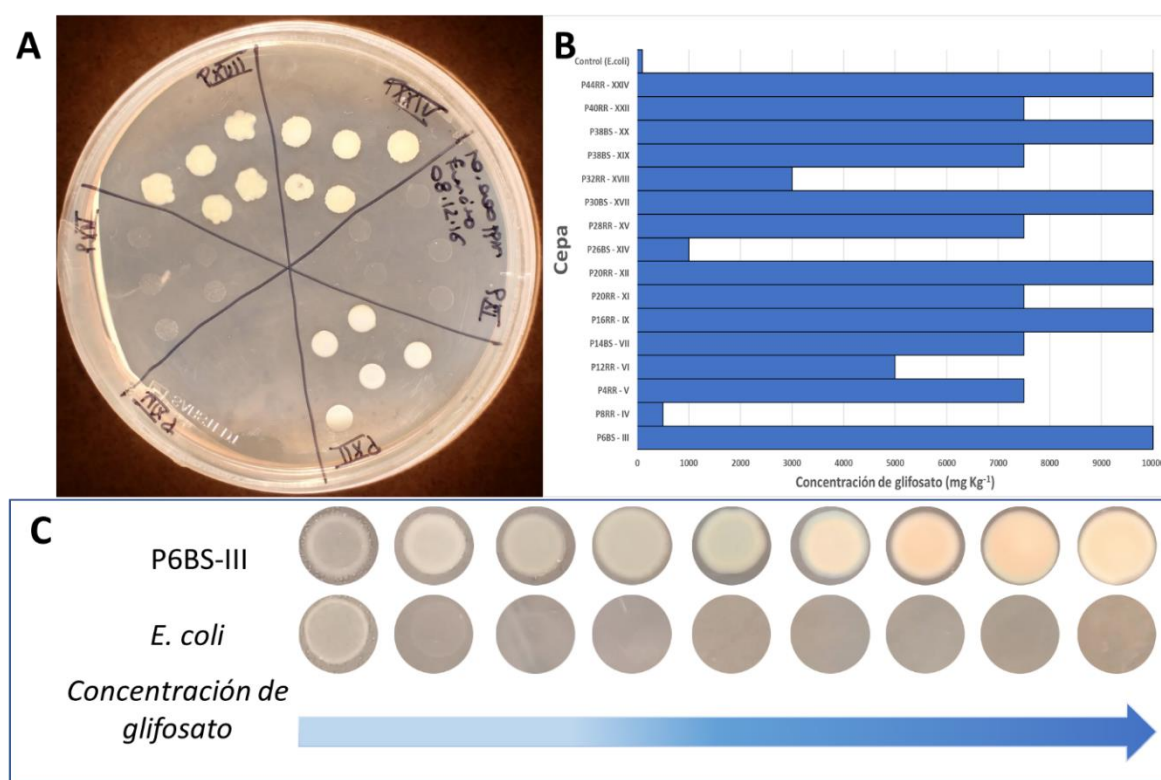
Cuando se hace mención en la literatura al nivel de tolerancia a glifosato de una determinada cepa, generalmente se remite a la concentración de glifosato presente en el medio de cultivo utilizado para su aislamiento, o bien a estudios posteriores en cultivos puros, evaluando la inhibición de crecimiento frente a dosis específicas (Pipke & Amrhein, 1988; Liu et al., 1991; Fan et al., 2012). Es posible encontrar experimentos utilizando diferentes dosis de glifosato en donde se examina la eficiencia catalítica de la enzima EPSP sintasa aislada a partir de un determinado microorganismo. Si bien existe una relación directa entre esta eficiencia catalítica y la tolerancia de la especie que la porta (ya que dichas enzimas tolerantes se encuentran a partir de aislar microorganismos tolerantes), la correcta caracterización de la tolerancia para un proceso de rizorremediación debe involucrar a la célula completa, ya que, si bien diferentes formas de EPSPS confieren distintos grados de tolerancia, existen varios mecanismos más allá de la acción de esta enzima que pueden complementarse para aumentar o disminuir dicha tolerancia, lo que repercute en viabilidad o crecimiento celular diferenciales. Por ejemplo, la capacidad que posean los microorganismos para utilizar al glifosato como fuente de fósforo y/o carbono podría resultar también en un incremento de la tolerancia.

Con las concentraciones estudiadas en este ensayo se pretendió explorar todo el rango posible de concentraciones que la solubilidad del glifosato en MSB permitiese, donde resulta ligeramente menor que en agua destilada (aproximadamente  $11,6 \text{ g L}^{-1}$ ). Valores de concentración entre estos rangos son los lógicamente encontrados en diferentes procesos de aislamientos (Shushkova et al., 2012; Kryuchkova et al., 2014). Como control del ensayo se seleccionó un microorganismo portador de la EPSPS Clase I, *E. coli*, ya que esta enzima es sensible, y no están reportados mecanismos de tolerancia y/o degradación en esta especie de forma silvestre (*wild type*).

Del total de cepas, 6 de ellas toleraron la mayor concentración de glifosato evaluada ( $10.000 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Entre ellas se encuentran todas aquellas del género *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium* sp. P30BS-XVII y dos *Rhizobium*, P16RR-IX y P44RR-XXIV. Otras 6 cepas fueron inhibidas por una concentración de  $7.500 \text{ mg kg}^{-1}$  (todas ellas del género *Rhizobium*), mientras que las restantes 4 lo hicieron con concentraciones menores. Los resultados coinciden con reportes bibliográficos, ya que el género *Ochrobactrum* posee naturalmente una enzima tolerante a glifosato, y que además presenta una adecuada capacidad catalítica (Tian et al., 2010). El género *Rhizobium* mostró una tolerancia variable,



siendo por ejemplo P8RR-IV tolerante a la dosis utilizada para el asilamiento ( $500 \text{ mg kg}^{-1}$ ) pero sensible a dosis mayores. *Phyllobacterium* sp. P30BS-XVI, que mostró crecimiento a máximas concentraciones evaluadas, no posee reporte de tolerancia a glifosato, hasta donde se tiene conocimiento. En la figura 5.3 se muestran los resultados del estudio, mientras que en la figura suplementaria S5.1.8 se muestra cepa por cepa la morfología de la cepa frente a diferentes concentraciones de glifosato. *E.coli* mostró crecimiento a dosis de  $100 \text{ mg kg}^{-1}$ , lo que indica que la concentración elegida para realizar el aislamiento resultó efectivamente adecuada para obtener microorganismos tolerantes.



**Figura 5.3.** Ensayo de tolerancia en placa. A. Ejemplo de una placa utilizada en el ensayo ( $10.000 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Puede observarse la inhibición que causó esta dosis en 3 de las 6 cepas evaluadas. B. Gráfico de barras que muestran cepa a cepa la concentración mínima inhibitoria obtenida. C. Se muestra la morfología en placa de las colonias de las cepas P6BS-III y control (*E.coli*) a las distintas dosis.

### 5.3.3. Estudios particulares sobre las cepas *Ochrobactrum* sp. P6BS-III y *Rhizobium* sp. P44RR-XXIV

Del total de cepas investigadas, *Ochrobactrum* sp. P6BS-III y *Rhizobium* sp. P44RR-XXIV fueron seleccionadas para llevar a cabo una profundización en su caracterización. *Ochrobactrum* sp. P6BS-III, posiblemente *Ochrobactrum haematophilum* (Kampfer et al., 2007), es una especie muy poco estudiada, y cuyo genoma no ha sido previamente secuenciado. Posee distintas capacidades de

promoción de crecimiento vegetal *in vitro*, como producción de AIA, diversos mecanismos de solubilización de fósforo y producción de sideróforos. A su vez, el género fue previamente reportado con la capacidad de degradar distintos xenobióticos (Kiliç, 2009; Abraham & Silambarasan, 2016; Chudasama & Thaker, 2017) y con la capacidad de promoción de crecimiento vegetal (Verma et al., 2004; Chakraborty et al., 2009; Khan et al., 2009).

*Rhizobium* sp. P44RR-XXIV, identificada a partir del gen del ARNr 16s como *Rhizobium lusitanum* (Valverde et al., 2006) presenta una muy buena tasa de crecimiento y un excelente grado de tolerancia a glifosato ( $\geq 10.000 \text{ mg kg}^{-1}$ ) con respecto al resto de las cepas del género, y a su vez una amplia gama de capacidades de promoción de crecimiento vegetal *in vitro* (en particular, la capacidad de producir AIA, acetoína y presentar actividad ACC-desaminasa), convirtiéndola en una candidata muy interesante para los ensayos de inoculación y posterior evaluación del sistema frente a una aplicación de glifosato (ver capítulo 6). El hecho de haberse obtenido la cepa a partir de un aislamiento de rizosfera incrementa *a priori* la posibilidad de obtener una interacción benéfica con la especie vegetal.

#### 5.3.3.1 Curvas de crecimiento de cultivos líquidos agitados en aerobiosis

Para realizar los estudios de crecimiento en medio MSB-Gly en el cual se determinó el número de UFC  $\text{mL}^{-1}$ , la DO a 600 nm y la concentración de glifosato a tiempo final, se hicieron dos subcultivos previos en el mismo medio, para remover cualquier posible fuente de fósforo que el glicerol u otra fuente alternativa pudiese aportar, y de esta forma considerar al glifosato como única fuente de fósforo.

*Ochrobactrum* sp. P6BS-III alcanzó el crecimiento máximo el día 2 con un valor promedio de  $2,0 \times 10^{11}$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ . A partir de este máximo, la DO se mantuvo constante hasta el cuarto día, mientras que el recuento de UFC disminuyó. A partir del cuarto día, ambos parámetros disminuyeron (figura 5.4A). *Rhizobium* sp. P44RR-XXIV mostró un perfil similar, que alcanzó un máximo de  $2,7 \times 10^{10}$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  al segundo día, y mantuvo una D.O. máxima hasta el sexto día (figura 5.4B). Algunos aspectos de estos experimentos merecen destacarse: el número de células en ambas curvas es notablemente alto, considerando que el crecimiento se ha realizado en un medio mínimo con  $2 \text{ g L}^{-1}$  de glucosa como fuente de carbono y glifosato como única fuente de fósforo. Desde una perspectiva biotecnológica, tales condiciones de crecimiento (composición mínima del medio, bajas temperaturas de cultivo  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  y crecimiento máximo entre el segundo y tercer día) implicarían un bajo costo de escalado durante la eventual producción de estas cepas como inoculantes.

También es importante señalar la relevancia de medir el UFC mL<sup>-1</sup> a lo largo del experimento, ya que el número máximo de células viables solo se correlaciona con el máximo D.O. entre el segundo y tercer día de experimento.

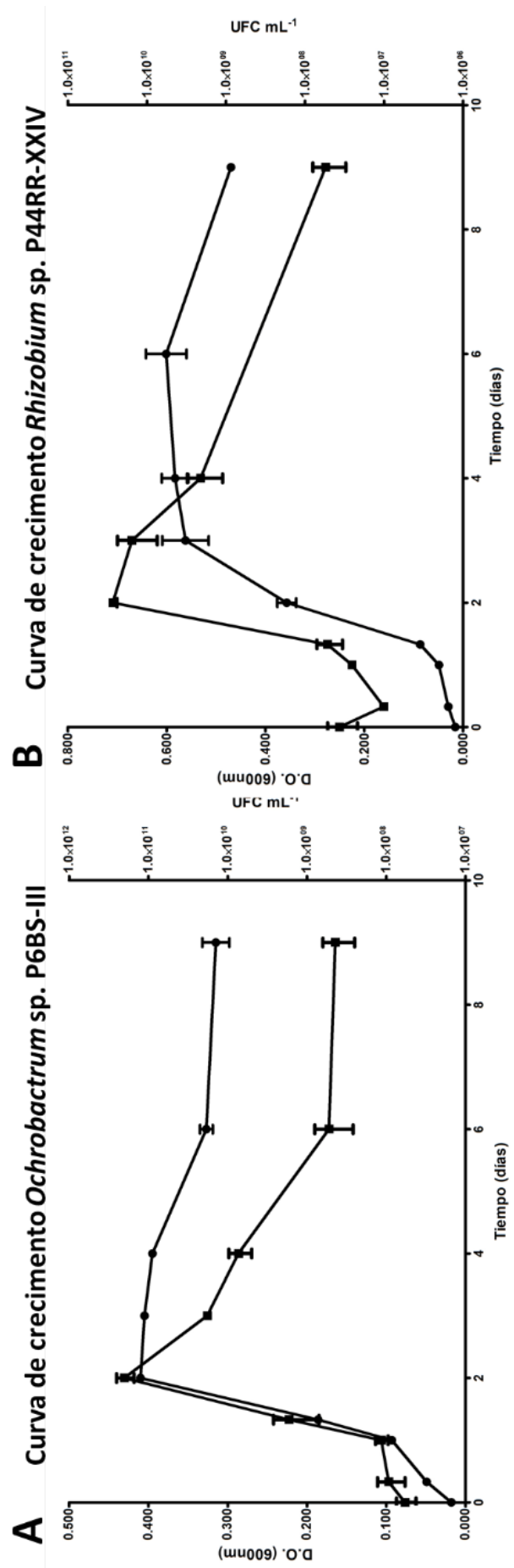
Los resultados de degradación de glifosato a tiempo final determinado mediante UPLC-MS se presentan en la tabla 5.4:

**Tabla 5.4.** Porcentajes de degradación de glifosato en las cepas obtenidos a partir de las dos metodologías utilizadas: En el laboratorio de la Facultad de Agricultura de la Universidad de Belgrado (A) y en Groen Agro Control (B).

Método	Degradación de glifosato (%)	
	<i>Ochrobactrum</i> sp. P6BS-III	<i>Rhizobium</i> sp. P44RR-XXIV
A	42 ± 14	49,2 ± 9,3
B	39,9 ± 2,9	20 ± 12

#### 5.3.3.2 Estudio del metabolismo utilizando el sistema GN2 MicroPlate™

El estudio de las distintas capacidades metabólicas se llevó a cabo de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Los resultados se muestran en la tabla 5.5. Se observó que *Ochrobactrum* sp. P6BS-III es capaz de asimilar un espectro más amplio de los compuestos que *Rhizobium* sp. P44RR-XXIV, incluyendo distintos carbohidratos, aminoácidos y ácidos carboxílicos. Los perfiles metabólicos obtenidos muestran que las dos cepas pueden utilizar distintas fuentes nutricionales simples más allá de la glucosa, factor que deberá tenerse en cuenta previo a la formulación del medio de cultivo para la producción a escala del inoculante, ya que dicha versatilidad sugiere que podrían ensayarse fuentes de carbono y energía más económicas que la glucosa. A su vez podría también postularse como alternativa, el crecimiento del microorganismo en medios formulados a base de efluentes contaminados con glifosato, provenientes de fábricas del agroquímico o de lugares contaminados de forma aguda.



**Figura 5.4.** Curvas de crecimiento para *Ochrobactrum* sp. P6BS-III (A) y para *Rhizobium* sp. P44RR-XXIV (B). Las curvas con puntos indican absorbancia a 600 nm, mientras que las curvas con rectángulos indican recuento de UFC mL<sup>-1</sup>.

**Tabla 5.5.** Perfil metabólico de las cepas obtenido mediante sistema GN2 MicroPlate™

Test bioquímico	<i>Ochrobactrum</i> sp. P6BS-III	<i>Rhizobium</i> sp. P44RR-XXIV	Test bioquímico	<i>Ochrobactrum</i> sp. P6BS-III	<i>Rhizobium</i> sp. P44RR-XXIV
<b>Carbohidratos</b>			<b>Aminoácidos</b>		
N-acetil-D-galactosamina	+	+	D-alanina	+	-
N-acetil-D-glucosamina	+	+	L-alanina	+	-
Adonitol	+	+	L-alanilglicina	-	+
L-arabinosa	+	-	L-asparagina	+	+
D-arabitol	+	+	Ácido L-aspartico	+	+
D-celobiosa	+	-	Ácido L-glutámico	+	+
<i>D</i> -eritriol	-	-	Ácido glicil-L-aspartico	+	-
D-fructosa	+	+	Ácido glicil-L-glutámico	+	-
L-fructosa	+	+	L-histidina	+	-
D-galactosa	+	+	Hidroxi-L-prolina	+	-
Gentiobiosa	+	+	L-leucina	+	-
$\alpha$ -D-glucosa	+	+	L-ornitina	+	-
m-inositol	+	+	Lfenilalanina	-	-
$\alpha$ -D-lactosa	-	+	L-prolina	+	+
lactulosa	-	-	Ácido L-piroglutámico	-	-
Maltosa	+	+	D-serina	-	-
D-manitol	+	+	L-serina	+	+
D-manosa	+	+	L-treonina	+	-
D-melibiosa	-	-	D,L-carnitina	+	-
$\beta$ -metil-D-glucósido	+	-	Ácido $\gamma$ -aminobutírico	+	-
D-psicosa	+	+	<b>Aminas</b>		
D-rafinosa	-	-	Feniletilamina	+	-
L-ramnosa	+	-	Putrescina	-	-
D-sorbitol	+	+	2-aminoetanol	+	-
sacarosa	+	-	<b>Compuestos aromáticos</b>		
D-trealosa	+	+	Ácido urocánico	-	-
Turanosa	+	+	Inosina	+	+
Xilitol	+	-	Uridina	-	-
<b>Ácidos carboxílicos</b>			Tiamina	-	-
Ácido acético	+	+	<b>Amidas</b>		
Ácido cis-acónito	+	+	Ácido succinámico	+	+
Ácido cítrico	-	+	Glucuronamida	+	-
Ácido fórmico	-	+	L-alaninamida	+	-
Ácido D-galactónico lactona	-	-	<b>Compuestos fosforilados</b>		
Ácido D-galacturónico	+	-	D,L- $\alpha$ -glicerol fosfato	+	-
Ácido D-glucurónico	+	-	Glucosa-1-fosfato	+	-
Ácido D-glucosamínico	-	-	Glucosa-6-fosfato	-	-
Ácido D-glucónico	+	-	<b>Alcoholes</b>		
Ácido $\alpha$ -hidroxibutírico	-	-	2,3-Butanodiol	+	+
Ácido $\beta$ -hidroxibutírico	+	-	Glicerol	+	+
Ácido $\gamma$ -Hidroxibutírico	+	-	<b>Ésteres</b>		
Ácido P-Hidroxifenilacético	-	-	Metil piruvato	+	-
Ácido Itacónico	+	-	Mono-metil-succinato	-	-
Ácido $\alpha$ -cetobutírico	+	-	<b>Polímeros</b>		
Ácido $\alpha$ -cetoglutárico	+	-	$\alpha$ -ciclodextrina	-	-
Ácido $\alpha$ -cetovalérico	+	-	Dextrina	+	+
Ácido D,L-láctico	+	-	Glucógeno	-	-
Ácido malónico	-	-	Tween 40	+	-
Ácido propiónico	+	-	Tween 80	+	-
Ácido quínico	+	-	<b>Compuestos bromados</b>		
Ácido D-sacárico	-	-	Ácido bromosuccínico	+	+
Ácido sebácico	-	-			
Ácido succínico	+	+			

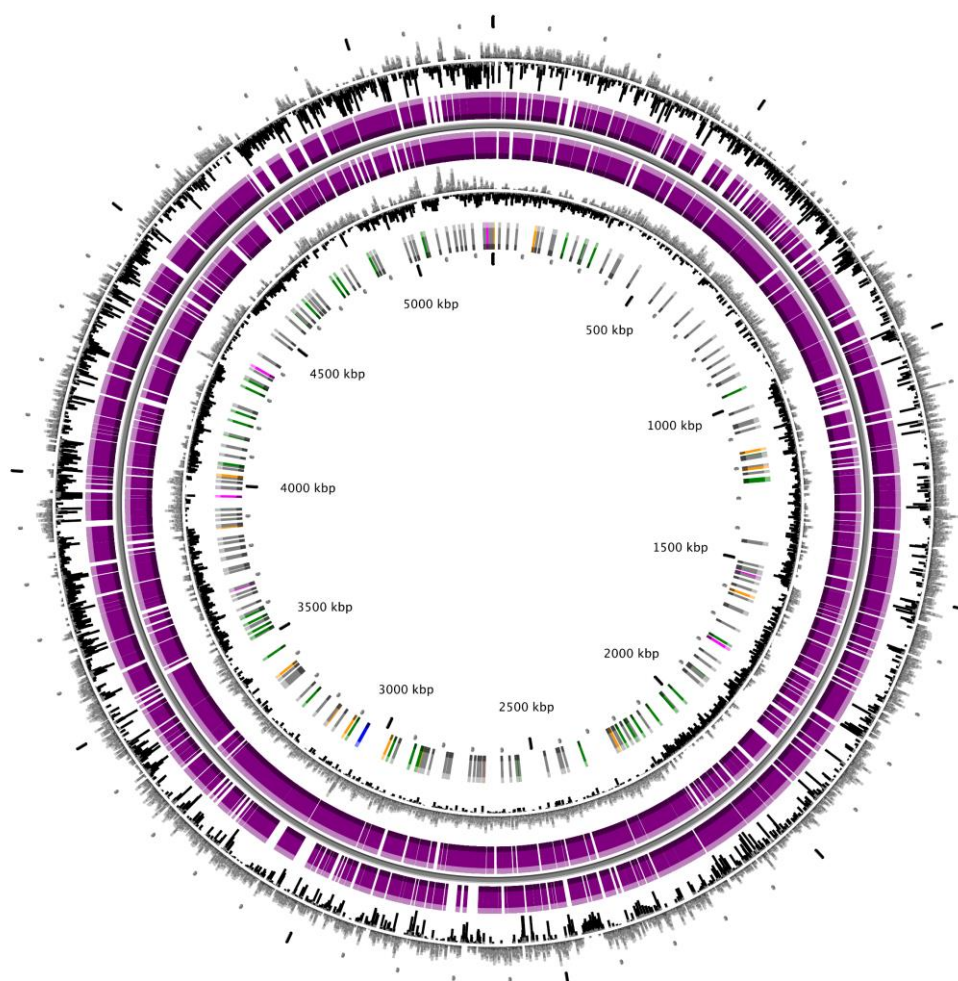
### 5.3.3.3 Estudios sobre el genoma de *Ochrobactrum* sp. P6BS-III

Una vez enviada para la secuenciación de su genoma, la cepa fue depositada en el cepario de la Universidad de Hasselt, bajo la identificación UHS000020 y también en el Laboratorio de Malezas y Herbicidas, como LMH00001. El proyecto de secuenciación del genoma se depositó en la *DNA Database of Japan* (DDBJ), *European Nucleotide Archive* (ENA) y el *GenBank* (NCBI) con el número de acceso MPPJ00000000.1 y *BioProject* PRJNA354074.

La secuenciación dio como resultado un total de 1,1 millones de lecturas o *reads* (longitud promedio: 308 bases), que generaron 345 millones de bases (Mb) de datos (324 Mb  $\geq$  Q20) en Torrent Suite 5.0.4. Estos se ensamblaron utilizando SPAdes 3.8.2 (modo de cobertura uniforme; kmers 21, 33, 55, 77, 99) en un total de 65 *contigs* mayores de 1000 pares de bases (pb), dando una longitud consenso de 5,253,115 pb y una cobertura promedio de 61,7 veces (contenido de GC 56,63%; *contig* más largo: 445.701 pb; N50 = 242.240 pb). El reordenamiento de los *contigs* fue realizado utilizando Mauve a partir del genoma de referencia más cercano, el *O. anthropi* ATCC 49188 (número de acceso GenBank GCA\_000017405.1), y luego se prosiguió con la anotación en las diferentes plataformas, de acuerdo con lo descrito en la sección 5.2.7. En la tabla 5.6 se presenta un resumen de los estadísticos del genoma, y en la figura 5.5 se muestra el genoma en forma circular de P6BS-III a modo de complemento gráfico.

**Tabla 5.6.** Atributos generales del genoma de *Ochrobactrum* sp. P6BS-III.

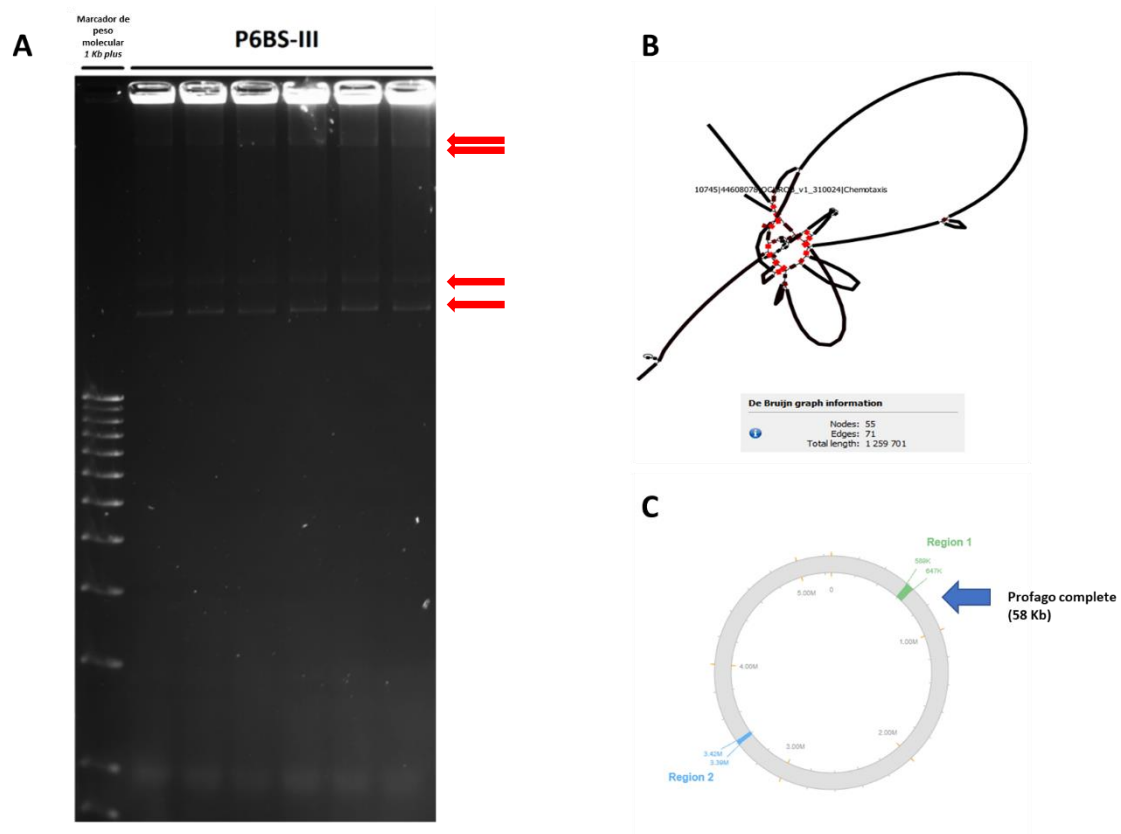
Atributo	Valor	% del Total
Tamaño del genoma (pb)	5.253.115	100
ADN codificante (pb)	4.639.026	88,31
ADN G+C (pb)	2.974.839	56,63
ADN <i>contigs</i>	65	100
Genes totales	5.526	100
Genes que codifican para proteínas	5.291	95,75
Genes de ARN	57	1,03
Pseudogenes	231	4,37
Genes en agrupamientos internos	81	1,53
Genes con predicción de función	5.204	94,17
Genes con asignación COG	4.587	86,69
Genes con dominios Pfam	4.973	93,99
Genes con péptidos señal	443	8,37
Genes con hélices transmembrana	1.201	22,7



**Figura 5.5.** Genoma circular de *Ochrobactrum* sp. P6BS-III. Los círculos muestran (de afuera hacia adentro): Porcentaje de desviación de GC; secuencias codificantes predichas en sentido horario; secuencias codificantes predichas en sentido antihorario; GC skew; y en el círculo más interno, ARNr (azul), ARNt (verde), RNAmisc (naranja), elementos relacionados con transposones (rosa) y pseudogenes (gris).

La interpretación de la electroforesis en gel de agarosa muestra la presencia de 4 elementos de distinto tamaño molecular, siendo aquellos cercanos al pocillo, posiblemente cromosomas o megaplásmidos. Si bien no pudo correrse en paralelo con un genoma de referencia del género, igualmente nos brinda información relevante respecto su organización, si conocemos cómo están organizados los genomas de referencia completamente secuenciados disponibles. El género *Ochrobactrum* posee dos cromosomas, al igual que *Brucella*, cuyos pesos moleculares para *O. anthropi* ATCC 49188 son de 2,89 Mb y 1,9 Mb. Aunque la diferencia de pesos moleculares entre ambos cromosomas parecería ser demasiada para la separación observada en las dos bandas más pesadas, en *Ochrobactrum* sp. A44 (GCA\_002278035.1) por ejemplo, los cromosomas tienen un tamaño de 2,59 y 2,01 Mb, situación mucho más cercana a lo que se observa en el gel. ATCC 49188 posee 4 plásmidos de tamaños de entre 0,17 y 0,06 Mb, y *O. anthropi* OAB (GCA\_000742955.1) posee dos plásmidos, de

0,16 y 0,11 Mb. Podría pensarse que P6BS-III presenta dos cromosomas y dos plásmidos. El software Bandage ensambló un fragmento de aproximadamente 1.3 Mb (Figura 5.6B) que coincide aproximadamente con el resultado obtenido por PlasmidSpades de un megaplásmido de 1.2 Mb. Utilizando la herramienta BLAST en NCBI con resultados obtenidos con PlasmidSpades, se vieron coincidencias con los plásmidos pOANT01 y pOANT02 de ATCC 49188 y el plásmido 2 de OAB. Las diferencias entre megaplásmidos, cromosomas de similar peso molecular o cromosomas lineales no se pueden distinguir sin correr un genoma de referencia, pero la información suministrada por el gel será esencial en un futuro cuando se intente “cerrar” el genoma y presentar una versión terminada del mismo. El software PHASTER, adicionalmente identificó una región intacta correspondiente a un profago de 58 kb (Figura 5.6C).



**Figura 5.6.** Estudios de la estructura del genoma de *Ochrobactrum* P6BS-III. A. Electroforesis del genoma completo de P6BS-III, en donde es posible distinguir dos elementos de alto peso molecular y dos de mediano peso molecular. B. Estructura de 1.3 Mb generada por Bandage. C. Análisis de con Phaster sobre todo el genoma, donde visualizan dos bandas, una que corresponde a la secuencia de un profago incompleto y otra (señalada) que corresponde a un profago completo.

Estudio de las propiedades asociadas a la tolerancia y degradación del glifosato.

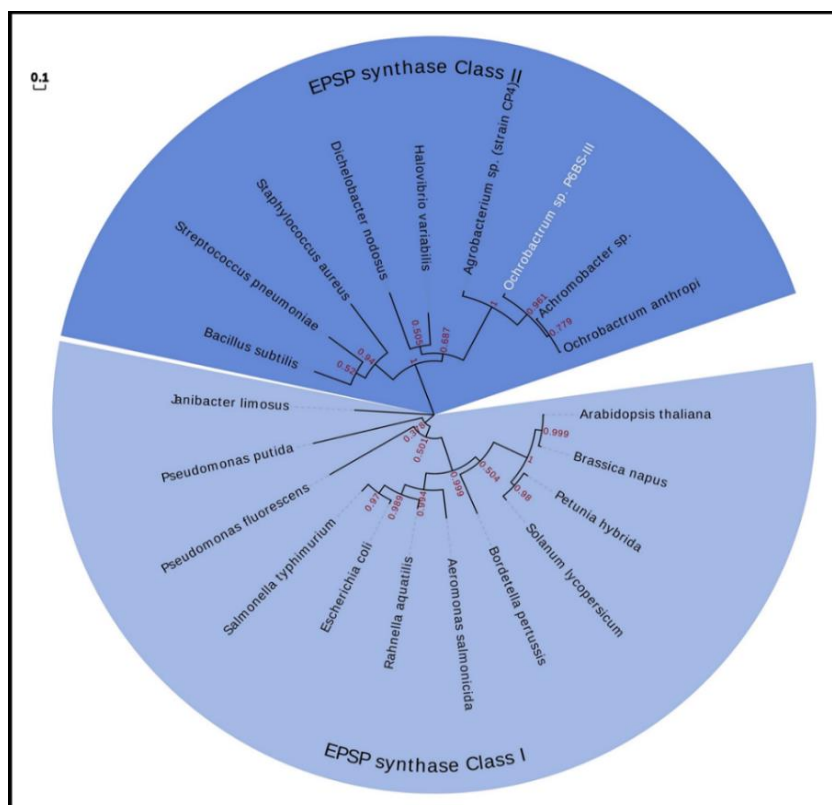


En lo que respecta a la tolerancia, el análisis del genoma reveló una copia única de la secuencia de la enzima EPSP sintasa de Clase II. Se realizó un análisis filogenético de esta secuencia utilizando el software MEGA (Kumar et al., 2016), que mostró que la EPSP sintasa P6BS-III está estrechamente relacionada con aquella presente en *Agrobacterium* sp. CP4 y otros miembros del género *Ochrobactrum* (Figura 5.7), en donde dos regiones bien conservadas de las enzimas Clase II, RXHTE y NPTR se encuentran presentes (Yi et al., 2016). El alineamiento múltiple indica la presencia de la sustitución P101L, que provoca cambios estructurales en el sitio activo al influir sobre la orientación espacial que tienen G96 y T97 respecto al sitio de unión al glifosato. Estos resultados, son coherentes con la tolerancia observada en la cepa en el punto 5.3.2.

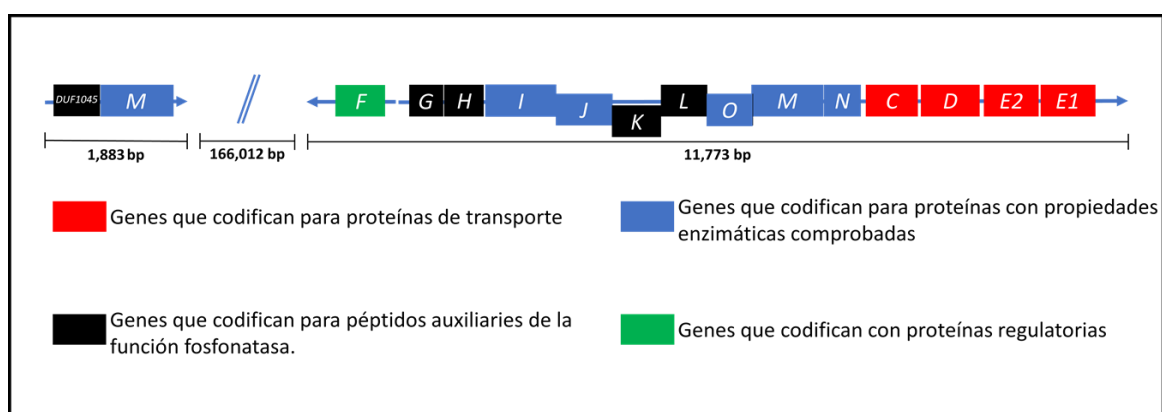
Se encontró también información relacionada a la degradación del glifosato. Secuencias homólogas al operón *phn* organizados en la posible unidad transcripcional *phnGHIJKLMNCDEE* correspondientes a la función C-P liasa (Seweryn et al., 2015), así como la región *phnM-DUF1045* de función desconocida, separada por 160.000 pb y previamente reportada en el género *Ochrobactrum* (Hove-Jensen et al., 2014) se describen en la figura 5.8. Los marcos de lectura se muestran en diferentes niveles verticales.

Existe un homólogo del gen de glicina oxidasa (ThiO) (EC 1.4.3.19), enzima involucrada en la degradación de glifosato (Zhan et al., 2013). Si bien esta enzima tiene la capacidad de oxidar el glifosato, la afinidad por este sustrato es baja en comparación con los sustratos fisiológicos, que son las aminas primarias y secundarias. Esta actividad no pudo comprobarse experimentalmente, al no detectarse AMPA presente en el medio de cultivo, aunque su potencial podría ser evaluado incrementando la concentración de glifosato en futuros ensayos.

Respecto a las capacidades de promoción de crecimiento vegetal, el genoma de *Ochrobactrum* sp. P6BS-III presenta homólogos de genes que codifican para nueve transportadores de fosfato de alta afinidad, genes de control del regulón PHO, 26 genes individuales relacionados con el metabolismo de fosfato, tres relacionados con la utilización de polifosfato y 17 con alquilfosfonatos (incluido el operón *phn*). Además, se encontraron homólogos de genes relacionados con la solubilización de fosfato de calcio y fitato, incluyendo 4-fitasa y el operón *pqqABCDE* implicado en la síntesis de ácido glucónico (An & Moe, 2016).



**Figura 5.7.** Árbol filogenético construido con las secuencias aminoácidas de EPSP sintasa. Las secuencias Clase I se obtuvieron de: *A. thaliana* (P05466), *B. napus* (P17688) *Petunia hybrida* (P11043) *Solanum lycopersicum* (P10748), *Bordetella pertussis* (P12421), *Aeromonas salmonicida* (Q03321), *Rahnella aquatilis* (C9EGX2), *E. coli* (P0A6D3), *Salmonella typhimurium* (P07637), *P. fluorescens* (A1Z0H6), *P. putida* (Q683S1) *Janibacter limosus* (L7PA93). Las secuencias Clase II se obtuvieron de: *B. subtilis* (P20691), *S. pneumoniae* (Q9S400), *S. aureus* (Q05615), *Dichelobacter nodosus* (Q46550), *Halovibrio variabilis* (Q1H624), *Agrobacterium* sp. CP4 (Q9R4E4), *Achromobacter* sp. LBAA (P0A2Y5), *O. anthropi* (A6WUV8). P6BS-III se muestra en letras blancas. El alineamiento múltiple de secuencias aminoácidas fue realizado utilizando el algoritmo *Muscle*, y el árbol filogenético se obtuvo mediante el método *Maximum Likelihood* con 1000 iteraciones (bootstraps) en el software MEGA versión 7.0



**Figura 5.8.** Estructura del posible operón *phn* de *Ochrobactrum* sp. P6BS-III

La absorción de hierro es llevada a cabo posiblemente a través de varios transportadores, como los ABC pitA, pitD, pitC y el sistema inducible a bajo pH. Se encontraron homólogos de genes implicados en la síntesis del sideróforo *Aerobactin*, aunque no todos los homólogos de la vía están presentes, siendo que están ausentes el de L-lisina-N-(6)-monooxigenasa (NADPH) y N6-hidroxilisina-O-acetiltransferasa. La producción de ácido indol acético probablemente se lleva a cabo mediante biosíntesis dependiente de triptófano, ya que fueron encontrados homólogos implicados en la síntesis de aminoácidos aromáticos junto con homólogos de la deshidrogenasa de aldehído, *aldA*, responsable de la oxidación del indol-3-acealdehído a indol-3-ácido acético.

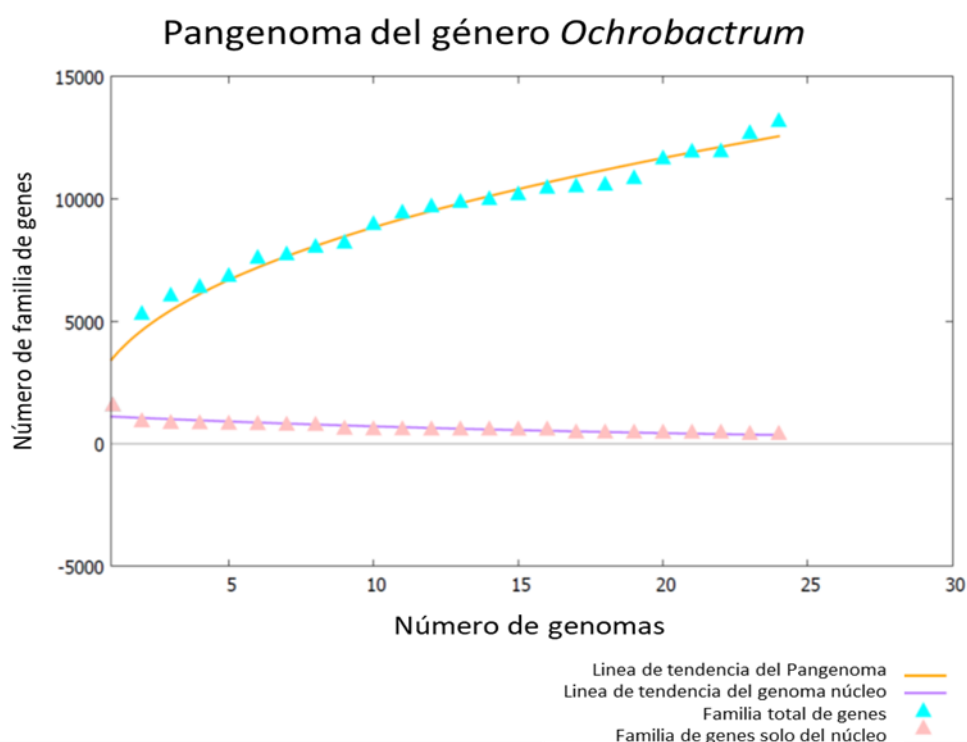
Como se mencionó anteriormente, la identificación de P6BS-III a partir del gen del ARNr 16s indicó que este se trataba, con un valor de identidad del 99,8, de *O. haematophilum* CCUG 38531. Al no existir ningún genoma secuenciado correspondiente a la especie *O. haematophilum*, se realizaron estudios comparativos *de genoma a genoma* enfrentando a P6BS-III con el resto de los genomas disponibles en GenBank. Para hacer la comparación, el algoritmo *Tetra Correlation Search* se usó para obtener una lista de los genomas de referencia más cercanos a P6BS-III y luego se ejecutaron los algoritmos ANIm, ANIb y GGDC 2.1 con los 14 genomas más cercanos. Los resultados obtenidos mostraron que P6BS-III no posee similitud a nivel especie con ninguna de las cepas estudiadas. Los resultados se muestran en la tabla 5.7.

**Tabla 5.7.** Comparación del genoma de *Ochrobactrum* sp. P6BS-III con otros genomas utilizando distintos métodos de comparación *genoma a genoma*.

Nombre de la cepa	BioProject	Tamaño (Mb)	% GC	ANIb (%)	ANIm (%)	GGDC (%)
<i>O. anthropi</i> OAB	PRJNA244571	4.9	56.1	80.05	85.9	24.7
<i>O. anthropi</i> ATCC 49188	PRJNA19485	5.21	56.2	80.03	85.94	24.7
<i>Ochrobactrum</i> sp. UNC390CL2Tsu3S39	PRJNA234825	4.62	56	80.18	85.82	24.6
<i>O. anthropi</i> ML7	PRJNA274439	4.9	56	80.19	85.81	24.7
<i>O. anthropi</i> CTS-325	PRJNA85133	4.73	56	80.17	85.82	24.7
<i>O. anthropi</i> 60a	PRJNA169004	4.59	56.1	80.46	86.15	25.7
<i>O. anthropi</i> W13P3	PRJNA238403	5.28	56.3	80.05	85.86	24.7
<i>Ochrobactrum</i> sp. EGD-AQ16	PRJNA215965	4.83	57.6	80.39	85.75	25
<i>O. intermedium</i> 2745-2	PRJNA233556	4.8	57.6	80.31	85.55	24.8
<i>O. intermedium</i> LMG 3301	PRJNA37725	4.73	57.7	80.27	85.58	24.8
<i>O. intermedium</i> M86	PRJNA178498	5.19	57.9	80.17	85.58	24.7
<i>B. inopinata</i> BO1	PRJNA41855	3.37	57.1	80.16	85.03	24.3
<i>B. suis</i> bv. 4 str.40	PRJNA34745	3.31	57.2	80.27	85.04	24
<i>Brucella</i> sp. BO2	PRJNA41857	3.31	57.2	80.21	84.99	24.1

Seguidamente, y por tratarse de un genoma nunca descrito, se realizó el análisis del pangenoma de *Ochrobactrum* spp., utilizando todas las cepas disponibles en la base de datos del NCBI a la fecha

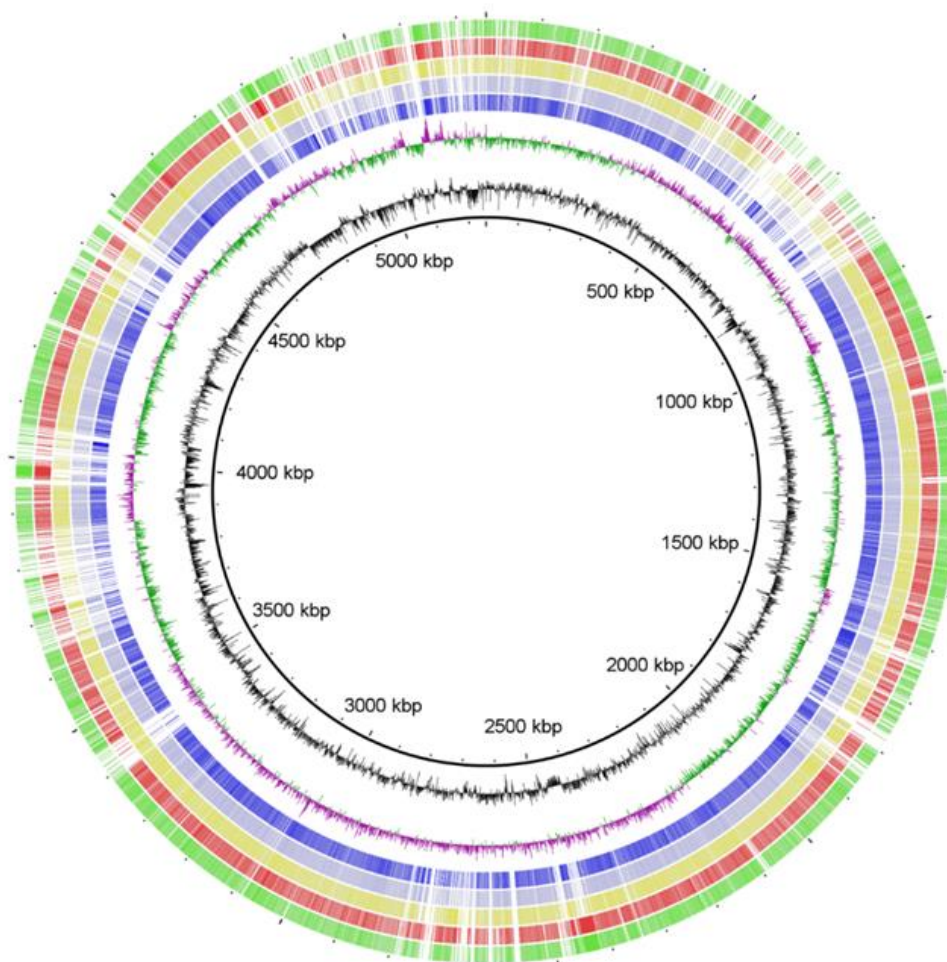
06-10-2017, con el objetivo de conocer el genoma núcleo (familia de genes compartidos por todos los miembros del género) y los genes con los que P6BS-III contribuye de manera exclusiva. Para ello se contó con el programa *Bacterial Pan Genome Analysis* (BPGA), utilizando en este caso el algoritmo de agrupamiento Usearch (Edgar, 2010) con *cut-off* de identidad para las secuencias del 50%. Una vez obtenidos los genes de cada categoría, se realizaron gráficos utilizando gnuplot 4.6.6 (Williams & Kelley, 2011). Los resultados se presentan en la figura 5.9.



**Figura 5.9.** Análisis del pangenoma del género *Ochrobactrum*.

Los resultados muestran que el pangenoma de 24 especies de *Ochrobactrum* depositadas en NCBI se compone de 13194 familias de genes ortólogos, y que el genoma núcleo está compuesto por 429 familia de genes. La línea de tendencia que define la evolución del pangenoma y del genoma núcleo no llega claramente a alcanzar un plató, indicando que futuras secuenciaciones de este género contribuirían de manera relevante a su caracterización, siendo esto lógico por tratarse de un género con tan pocos genomas reportados. P6BS-III contribuye con 744 genes únicos al pangenoma, siendo esta contribución muy significativa, y que, a su vez, da indicios indirectos de ser otra especie distinta a *O. anthropi*, la cual está sobrerrepresentada en la base de datos. De sus genes únicos, 158 tienen asignado algún tipo de predicción de función (cotejado con base de datos de COG y KEGG), mientras que el resto no tienen función conocida.

Se realizó también, un análisis gráfico complementario al estudio del pangenoma, utilizando el programa BRIG, en donde se comparó el genoma completo de *Ochrobactrum* P6BS-III con el de la *type strain* de *O. anthropi* y otras especies relevantes del género (Figura 5.10). El gráfico asigna una barra de color cuando encuentra un homólogo de un gen anotado en el genoma base (en este caso, P6BS-III) en cada uno de los anillos externos que corresponden a los otros genomas. Es así entonces que se crean “regiones de alta homología”, que dan idea de un continuo o barra de color, y “regiones de baja homología”, que dan el aspecto de una línea discontinua. Estas regiones pueden estar asociadas con presencia de plásmidos o con islas génicas en donde se podrían ubicar los genes únicos que posee la cepa. Se encontró también que una región de baja sintenia coincide con el profago encontrado con el programa Phaster.



**Figura 5.10.** Comparación del genoma de *Ochrobactrum. sp.* P6BS-III con genomas representativos del género mediante BRIG. Los anillos, de adentro hacia afuera representan: contenido GC, GC Skew, comparación con *O. anthropi* ATTC 49188 (Azul Oscuro), *O. anthropi* OAB (azul claro), *O. intermedium* LMG 3301 (amarillo), *O. pituitosum* AA2 (rojo), and *O. pseudogrignone* K8 (verde). Todos los genomas incluyen plásmidos.

Podría proponerse a partir de la figura 5.10, que los genes únicos encontrados en el genoma de P6BS-III mediante el análisis de pangenoma, se corresponden con los espacios vacíos o zonas de no homología respecto a los genomas de las *type strains*. Este análisis complementario refuerza aún más la importancia del aporte de este genoma al género.

#### 5.3.3.4 Estudios sobre el genoma de *Rhizobium* sp. P44RR-XXIV

Una vez enviada para la secuenciación de su genoma, la cepa fue depositada en el cepario de la Universidad de Hasselt bajo la identificación UHS000021 y también en el Laboratorio de Malezas y Herbicidas como LMH00002. El proyecto de secuenciación del genoma se depositó en la *DNA Database of Japan* (DDBJ), *European Nucleotide Archive* (ENA) y el *GenBank* (NCBI) con el número de acceso MPVZ00000000.1 y *BioProject* PRJNA354620.

Para P44RR-XXIV, un total de 1,65 millones de *reads* (longitud media: 296 bases) generaron 488 Mb de datos ( $458 \text{ Mb} \geq Q20$ ) en Torrent Suite 5.0.4. Las *reads* se ensamblaron utilizando SPAdes 3.8.2 (modo de cobertura uniforme; k-mers 21, 33, 55, 77, 99) en un total de 119 *contigs* mayores de 1000 pb, dando una longitud consenso de 7,446,815 pb y una cobertura promedio del 61,5% genoma (*contig* más grande 750,306 pb; N50 = 280,104 pb).

Posteriormente, se repitió la secuenciación en un equipo Ion S5 XL System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE.UU.) en donde se logró disminuir la cantidad de *contigs* a 29. Las estadísticas del genoma se muestran en la tabla 5.8.

El ADN genómico total analizado mediante gel de agarosa reveló uno o tal vez dos elementos de muy alto peso molecular (en duda, ya que no se observan dos bandas en todos los replicados), seguido de varios elementos de menor peso molecular posiblemente atribuibles a plásmidos o a ADN fragmentado (Figura 5.11A). Si bien no se dispuso de un genoma de *Rhizobium* al momento de correr el gel, a diferencia de lo sucedido con P6BS-III, aquí sí se encuentran disponibles microorganismos filogenéticamente cercanos (ya sea tanto por ribotipificación como por comparación genoma a genoma), por lo cual puede complementarse el análisis utilizando Mauve.

**Tabla 5.8.** Atributos generales del genoma de *Rhizobium* sp. P44RR-XXIV

Atributo	Primer secuenciación		Segunda secuenciación	
	Valor	% del Total	Valor	% del Total
Tamaño del genoma (pb)	7.458.574	100	7.408.308	100
DNA codificante (pb)	6.589.650	88,35	-	-
DNA G+C (pb)	4.436.360	59,48	4.370.902	59,5
DNA <i>contigs</i>	119	100	29	100
Genes totales	7.133	100	7.445	100
Genes que codifican para proteínas	6.579	95,75	7.229	98.04
Genes de ARN	65	1,03	58	0,78
Pseudogenes	489	4,37	-	-
Genes en agrupamientos internos	-	-	80	1.07
Genes con predicción de función	-	-	6.263	84.12
Genes con asignación COG	-	-	6.225	83.61
Genes con dominios Pfam	-	-	6.126	82.28
Genes con péptidos señal	-	-	653	8.77
Genes hélices transmembrana	-	-	1.749	23.49

El reordenamiento de *contigs* se llevó a cabo utilizando un genoma de referencia de *Rhizobium* más cercano completamente secuenciado y cerrado, *Rhizobium tropici* CIAT 899 (GCA\_000330885.1). El genoma de P44RR-XXIV se comparó también con otros dos genomas, uno correspondiente a la cepa más cercana de acuerdo con la información del gen ARNr 16S, y el otro correspondiente a la cepa más cercana de acuerdo con los resultados obtenidos a partir del análisis de ANIm, ANIb y GGDC (Tabla 5.9). Ellos son *R. lusitanum* P7 (NZ\_FMAF000000000.1) y *Rhizobium* sp. AC27/96 (NZ\_LXKN000000000.1) respectivamente (Figura 5.11B).

El cromosoma y los tres plásmidos pertenecientes al genoma de CIAT 899 se muestran cada uno de ellos enmarcados en rojo en la parte superior de la figura 5.11B. En este primer ordenamiento de *contigs* entre CIAT 899 y P44RR-XXIV, cuya intención es alinear la mayor cantidad de regiones homólogas de secuencia entre ambos genomas, tomando como referencia al genoma cerrado, se aprecia que el cromosoma de CIAT 899 presenta un gran número de bloques (LCBs o “*Locally Colinear Blocks*” por sus siglas en inglés) presentes en 6 *contigs* de gran extensión de P44RR-XXIV. Los LCB son segmentos de secuencia que, bajo cierto grado de incertidumbre, estarían exentos de participar de arreglos dentro del genoma. Por ello, las secuencias dentro de estos bloques pueden considerarse como aquellas altamente conservadas (regiones de sintenia) para ambos genomas comparados. Puede proponerse entonces que el cromosoma de P44RR-XXIV está compuesto por lo menos por esos 6 *contigs*.

Es posible observar dentro de las secuencias alineadas con el cromosoma, una inversión de gran extensión (bloque color amarillo), y una inserción y delección (espacios en blanco dentro de los bloques). Los plásmidos de CIAT 899 no estarían presentes en el genoma de P44RR-XXIV (se observan una serie de bloques que tienen regiones de homología dentro del plásmido pRtcCIAT899c, pero no se encuentra completo).

Los *contigs* que en P44RR-XXIV presentan un alto grado de homología de secuencia se marcan con una barra verde debajo de los mismos, ya que las siguientes comparaciones debieron hacerse necesariamente de genoma *draft* (borrador o incompleto), a genoma *draft*. Hacer esto entonces ayuda a localizar aquellos loci en los genomas a comparar que corresponderían al posible cromosoma de P44RR-XXIV. Si bien no puede afirmarse que el cromosoma de P44RR-XXIV esté constituido solamente por esos 6 *contigs*, marcarlos resulta de gran utilidad ya que nos sirven de referencia para ubicar aquellos *contigs* asociados a cromosomas en los otros *Rhizobium* y observar rearrreglos, además de posibles plásmidos compartidos entre cepas.

El segundo ordenamiento, que se muestra en la parte central de la figura 5.11B, es el que corresponde a P44RR-XXIV y *R. lusitanum* P7 (esta vez con P44RR-XXIV en la parte superior, ya que es el que se utiliza como guía por el programa, por disponer de un menor número de *contigs* y a la vez de mayor extensión). La comparación revela que las secuencias correspondientes a los *contigs* relacionados con el cromosoma de CIAT 899 también están presentes en el genoma de P7, esta vez sin la inversión observada entre CIAT 899 y P44RR-XXIV, e incluyendo un mayor número de inserciones y delecciones. El orden de los *contigs* en P7 es en este caso difícil de predecir, ya que P7 dispone de 79 *contigs* en total. En este genoma vemos también que el *contig* de mayor extensión en P44RR-XXIV (*contig* 1, 1.976.189 pb, ubicado en el extremo derecho), también posee cierto grado de representación en P7, aunque aun así es incompleto. El resto de los *contigs* de P44RR-XXIV, posiblemente atribuibles a plásmidos o regiones repetitivas, no poseen homología de secuencia en el genoma de P7.

Por último, se realizó la comparación entre P44RR-XXIV y *Rhizobium* sp. AC27/96, la que se muestra en la parte inferior de la figura 5.11B. En ella se observa que además de coincidir los *contigs* correspondientes al cromosoma de CIAT 899, también se corresponden el *contig* de mayor tamaño en P44RR-XXIV y los *contigs* restantes de gran tamaño (*contig* 3 parcialmente, y *contig* 9 y *contig* 10 en su totalidad, incluyendo alrededor de 700.000 pb adicionales). Esta similitud entre ambos genomas es interpretada por el algoritmo ANIm como coincidencia a nivel especie (ANIm > 95%), mientras que otras metodologías lo dan como no perteneciente a la misma especie, si bien en todas ellas presenta el más alto valor en la comparación (Tabla 5.9).



En este caso, la comparación del genoma de P44RR-XXIV con los tres genomas restantes nos revela una estrategia para comenzar a cerrar el cromosoma, mediante la búsqueda de CDS compartidos entre dos fragmentos distintos.

Tanto las comparaciones genoma a genoma como el análisis con Mauve indican que *R. sp.* AC27/96 es el genoma más similar disponible bases de datos (GenBank y JGI), tanto en extensión como en el grado de ordenamiento. Una cantidad apreciable de bases (alrededor de 90 kb que se corresponden con dos contigs del genoma de P44RR-XXIV) no están representadas en absoluto en AC27/96, por lo que, junto con la región de baja homología dentro del *contig* 3 (en la parte central de la figura) posiblemente determinen que ANIb y GGDC den la no correspondencia a nivel de especie entre ambos genomas.

El software PHASTER no identificó en este caso fagos ni profagos completos (Figura 5.11C).

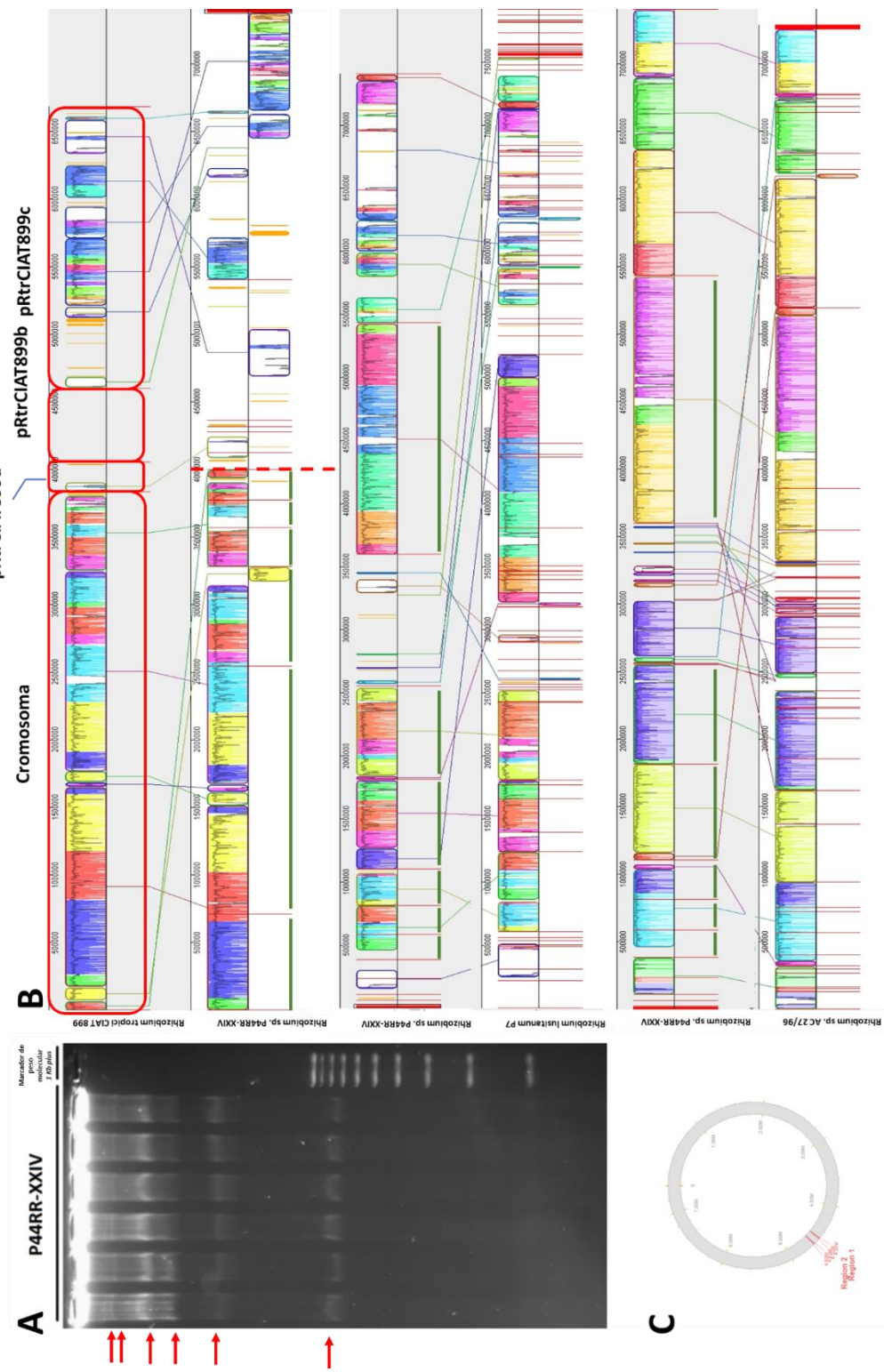
**Tabla 5.9.** Comparación del genoma de *Rhizobium* sp. P6BS-III con otros genomas utilizando distintos métodos de comparación *genoma a genoma*.

Nombre de cepa	BioProject	Tamaño (Mb)	% GC	ANIb (%)	ANIm (%)	GGDC (%)
<i>R. freirei</i> PRF 81	PRJNA13459	7.08	59.96	83.48	86.62	29.2
<i>Rhizobium</i> sp. AC27/96	PRJNA319063	7.29	59.7	94.57	95.13	60.6
<i>Rhizobium</i> sp. CF142	PRJNA83051	7.46	60.2	75.16	84.23	21.5
<i>Rhizobium</i> sp. YK2	PRJNA324744	7.16	59.7	82.14	85.98	27.4
<i>R. tropici</i> CIAT 899	PRJNA42391	6.69	59.51	82.09	86.09	27.5
<i>R. rhizogenes</i> NBRC 13257	PRJNA224116	7.04	59.91	80.39	85.60	25.6
<i>R. rhizogenes</i> ATCC 15834	PRJNA240998	7.06	60	80.44	85.59	26.7
<i>R. lusitanum</i> P7	PRJEB14985	7.92	59.6	84.61	87.74	31.5
<i>A. radiobacter</i> K84	PRJNA13402	7.27	59.87	80.41	85.59	25.6
<i>Rhizobium</i> sp. AP16	PRJNA83035	6.50	60.21	80.45	85.57	25.6

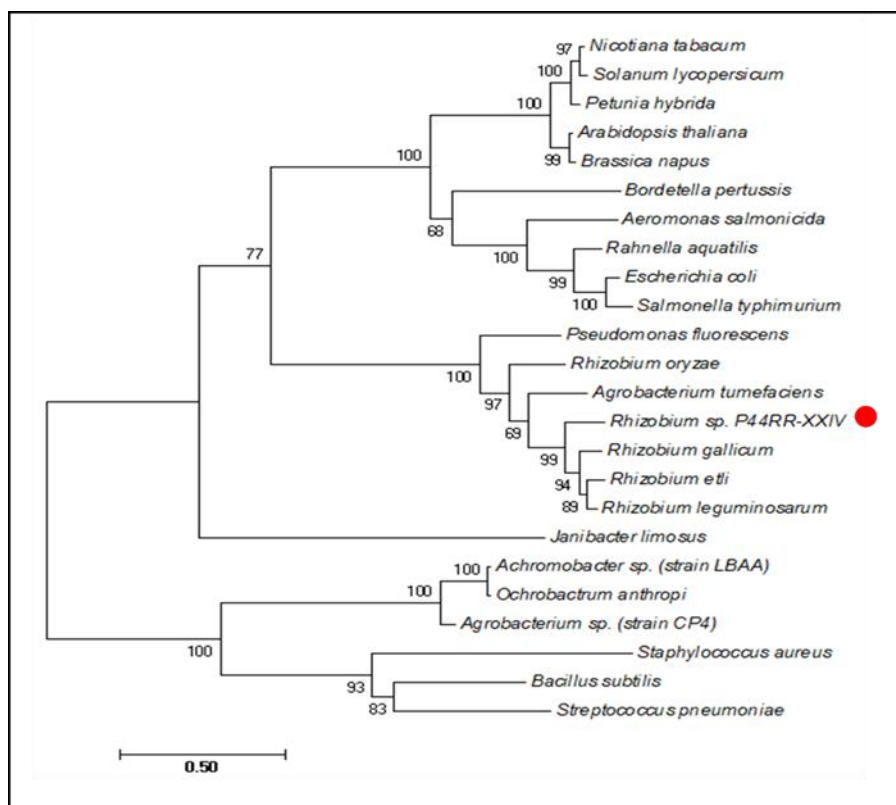
Estudio de las propiedades asociadas a la tolerancia y degradación del glifosato.

El genoma de P44RR-XXIV revela una copia única de la secuencia de la enzima EPSP sintasa, de 431 residuos aminoácidos. El análisis filogenético de las secuencias de distintas EPSP sintasas agrupó a la EPSP sintasa de P44RR-XXIV junto con las secuencias de otros miembros de *Rhizobium* spp. y en un clado aparte al correspondiente a la secuencia de Clase I donde se encuentra la EPSP sintasa de la *E. coli* y distintas especies vegetales (Figura 5.12).

En ese mismo análisis puede notarse también el agrupamiento dentro del mismo clado de las secuencias típicamente Clase II, como *Agrobacterium* sp. CP4, *O. anthropi* y *S. aureus*.



**Figura 5.11.** Estudios de la estructura genómica de *Rhizobium* sp. P44RR-XXIV. Electroforesis en gel de agarosa de los elementos genómicos de *Rhizobium* sp. P44RR-XXIV (A). Alineamiento y reordenamiento de *contigs* del genoma de P44RR-XXIV con aquellos genomas de referencia más relevantes (B). Resultado de la búsqueda de fagos y profagos utilizando Phaster (C)



**Figura 5.12.** Árbol filogenético construido con las secuencias aminoacídicas de EPSP sintasa. Las secuencias Clase I se obtuvieron de: *A. thaliana* (P05466), *B. napus* (P17688) *Petunia hybrida* (P11043) *S. lycopersicum* (P10748), *Nicotiana tabacum* *B. pertussis* (P12421), *Aeromonas salmonicida* (Q03321), *R. aquatilis* (C9EGX2), *E. coli* (P0A6D3), *Salmonella typhimurium* (P07637), *P. fluorescens* (A1Z0H6), *P. putida* (Q683S1) *Janibacter limosus* (L7PA93). Las secuencias Clase II se obtuvieron de: *B. subtilis* (P20691), *S. pneumoniae* (Q9S400), *S. aureus* (Q05615), *Dichelobacter nodosus* (Q46550), *Halovibrio variabilis* (Q1H624), *Agrobacterium* sp. CP4 (Q9R4E4), *Achromobacter* sp. LBAA (P0A2Y5), *O. anthropi* (A6WUV8). P44RR-XXIV se señala con un círculo rojo. El alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas fue realizado utilizando el algoritmo *Muscle*, y el árbol filogenético se obtuvo mediante el método *Maximum Likelihood* con 1000 iteraciones (bootstrap) en el software MEGA versión 7.0.

Para profundizar en el análisis de esta EPSP sintasa en particular, se comparó la secuencia aminoacídica de P44RR-XXIV con las de *E. coli*, *Agrobacterium* sp. CP4 y otros miembros representativos de ese mismo clado mediante un alineamiento de secuencias aminoacídicas (Figura 5.13).

La exploración de variantes de EPSP sintasa obtenidas, ya sea a partir de microorganismos tolerantes o distintos métodos de mutagénesis, es generalmente un recurso que se utiliza para diseñar nuevas versiones de especies vegetales transgénicas, que sean capaces de tener una eficiencia catalítica similar a la enzima *wild type* y, que a la vez, sea resistente a altas dosis de glifosato (Funke et al., 2009; Pollegioni et al., 2011; Tian et al., 2011). Si bien no es el objetivo de este trabajo evaluar la idoneidad de la enzima para ser utilizada en un evento transgénico, estos estudios ofrecen información sobre aquellas regiones de la enzima hallada que podrían resultar relevantes, tanto por su tolerancia a glifosato como por su capacidad catalítica.

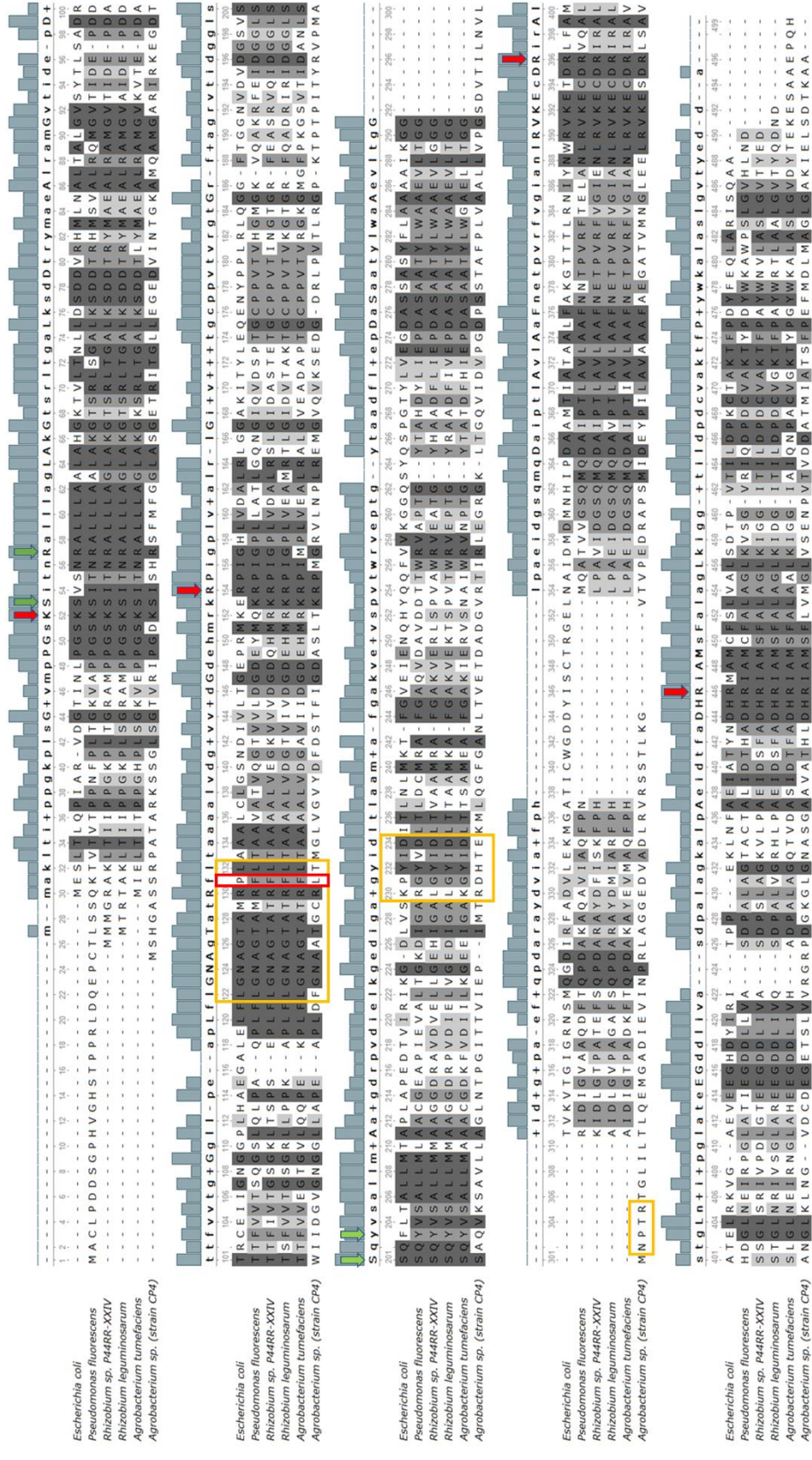
La comparación de secuencias reveló la sustitución P101F (posición 131 en el alineamiento, marcada en un rectángulo rojo), que es una sustitución atípica de aquellas encontradas generalmente en las enzimas de Clase I, como pueden ser P101S, P101T o P101A. Todas las enzimas analizadas agrupadas en ese clado poseen la misma sustitución.

La enzima Clase II de CP4, con la sustitución P101L, también posee otros residuos cuya presencia está relacionada con conferirle tolerancia y eficiencia catalítica, y que se marcan en la figura con recuadros amarillos. Estudiar estas regiones es necesario cuando existe una diferencia de secuencia importante respecto a las enzimas de Clase I ya que la variabilidad de secuencias que se observan en bacterias no se observa en especies vegetales, en donde la estrategia para la investigación de la tolerancia en la enzima consiste en investigar el residuo en posición 101, como se desarrolló en el capítulo 3 de esta tesis.

En el primer recuadro amarillo (siguiendo la numeración del alineamiento) se señala la secuencia LGNAGTAXRXL (donde X representa a cualquier aminoácido), que es una región altamente conservada y crítica para la unión del fosfoenol piruvato a la enzima (Yi et al., 2016). La EPSP sintasa tolerante de P44RR-XXIV posee mayor similitud de secuencia a la típica EPSP sintasa Clase I de *E. coli* que a la de Clase II de *A. sp.* CP4. Esto podría indicar a priori, y ya conociendo el grado de tolerancia que le confiere a la cepa, que la capacidad catalítica podría estar conservada respecto a aquellas de Clase I. En el segundo y tercer recuadro amarillo, se señalan aquellos residuos presentes en enzimas de Clase II RXHXE y NXTR que están implicados en la desestabilización de la unión a glifosato (Li et al., 2009; Tian et al., 2010). La región correspondiente a la secuencia RXHXE en P44RR-XXIV difiere de aquellas típicas de cada clase, y es similar a la de otros miembros de la familia *Rhizobiaceae* analizados. La secuencia NXTR no se encuentra presente en P44RR-XXIV, así como en las demás enzimas Clase I.

Los residuos individuales implicados en la unión de fosfoenol pituvato y shikimato-3-fosfato, que se señalan en la figura con flechas verdes y rojas respectivamente, se conservan en todas las secuencias, excepto en el residuo en la posición 203, en donde se observa la sustitución F203Y, de un aminoácido aromático por otro, y lo que no ocurre en *A. sp.* CP4, donde la sustitución F203Q deviene en el reemplazo de un aminoácido aromático por uno alifático.





**Figura 5.13** Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas de EPSP sintasas representativas de cada Clase, donde se incluyen también secuencias del clado donde está incluida la EPSP sintasa de P44RR-XXIV, realizado utilizando el algoritmo de alineamiento T-COFFEE. La visualización del alineamiento se realizó utilizando Unipro UGENE v.1.26.1. En recuadro rojo, se observa la sustitución crítica responsables de conferir tolerancia en especies vegetales y bacterianas. En recuadros amarillos, se señalan regiones involucradas en la unión del fosfoenol piruvato y en la desestabilización de unión al glifosato. En flechas rojas y verdes se señalan los residuos individuales implicados en la unión de fosfoenol pituvato y shikimato-3-fosfato, respectivamente.

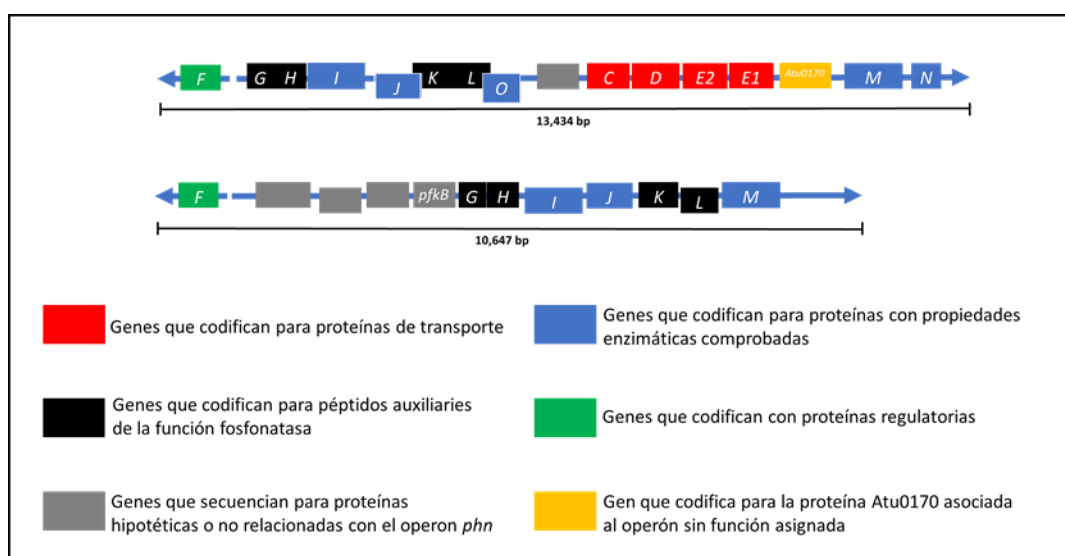
Podría proponerse que la sustitución de la región RXHXE por los residuos LGYID y la sustitución P101L contribuyen con conferirle resistencia a glifosato en la EPSP sintasa de P44RR-XXIV. Si bien existe suficiente sustento bibliográfico para arribar a esta conclusión, hacerlo a partir del análisis de estos residuos sin contar con la estructura de la proteína, y existiendo tanta diferencia entre la EPSP sintasa de P44RR-XXIV y las típicas de Clase I y Clase II, sería quizás apresurado; aunque definitivamente es material suficiente para continuar con el análisis de este grupo de enzimas en un futuro.

El foco del análisis se hizo sobre las regiones previamente caracterizadas de la enzima, y es evidente que también el resto de los miembros del género *Rhizobium* analizados poseen los mismos residuos aminoácidos que P44RR-XXIV en las regiones críticas mencionadas. En este trabajo se obtuvieron, a partir del procedimiento de aislamiento, varias cepas de *Rhizobium* spp. que presentaron distinto grado de tolerancia al herbicida (ver sección 5.3.2). Si bien las secuencias de estas enzimas no se incluyen en el análisis, el grado de conservación de estas secuencias en las regiones estudiadas dentro del género (se observó también con otras secuencias de *Rhizobium* que no se muestran), lleva a proponer dos posibles alternativas respecto a al alto nivel de tolerancia registrado específicamente en P44RR-XXIV: 1- Las diferencias de secuencia aminoácida de *Rhizobium* sp. P44RR-XXIV respecto del resto del género son las responsables en conferirle un alto grado de tolerancia, o 2- Otros mecanismos de tolerancia, como la degradación, compartimentalización o transformación de la molécula de glifosato son relevantes en el análisis de la tolerancia global (menos probable que el anterior, por la velocidad de crecimiento de la cepa y el porcentaje de degradación del herbicida).

Teniendo en cuenta las diferencias estructurales de esta enzima con las enzimas de Clase I y II, siendo que a su vez presenta similitud de secuencia con el resto de las enzimas de su género, sería interesante en el futuro realizar estudios estructurales y bioquímicos sobre esta EPSP sintasa. Dichos estudios, permitirían no solamente explicar el grado de tolerancia que posee, sino también evaluar la eficiencia catalítica en presencia y ausencia de glifosato para compararlas con otras enzimas disponibles comercialmente y poder evaluar así su valor biotecnológico. En un estudio realizado por Han y colaboradores (2014), se caracteriza una EPSP sintasa de *R. leguminosarum*, aunque la secuencia corresponde a una enzima de Clase II, por lo que no se asemeja a las aquí analizadas.

En cuanto a la degradación de glifosato, están presentes secuencias homólogas correspondientes al operón *phn* organizados en la posible unidad transcripcional *phnGHIJKLOCDEEMN*, y similar al caracterizado en miembros de la familia *Rhizobiaceae*, como *A. radiobacter*, *R. leguminosarum* WSM1325 y *R. etli* CFN42 (Hove-Jensen et al., 2014).

Se encontró a su vez el operón *phnGHIJKLM*, ubicado en el *contig* de mayor extensión (*contig* 1), de posible origen plasmídico (Figura 5.11). Este operón posee dudosa actividad fosfonatasa *per se*, ya que no posee la función *aminoalquilfosfonato N-acetiltransferasa* proporcionada por *phnO*. Tanto *Mesorhizobium loti* como *Sinorhizobium meliloti* poseen plásmidos en donde pueden encontrarse distintos arreglos de operones *phn*, que difieren en estructura respecto al de P44RR-XXIV (Kaneko et al., 2000; Finan et al., 2001). Hasta la fecha, este constituye el primer registro de homólogos del operón *phn* en el género *Rhizobium/Agrobacterium*. Las estructuras de estos dos operones se muestran en la figura 5.14.



**Figura 5.14.** Homólogos de los diferentes péptidos *phn* hallados en *Rhizobium* sp. P44RR-XXIV, organizados en dos posibles operones.

Una diferencia adicional que podemos encontrar entre este arreglo de genes y el de *Ochrobactrum* sp. P6BS-III, más allá de la presencia de dos operones *phn*, es que estos dos loci presentan genes que codifican para proteínas hipotéticas dentro de la secuencia del operón, y que *a priori*, no estarían relacionados con su función. La caracterización de estas proteínas puede ser, en un futuro, motivo de gran interés ya que podrían explicar el alto grado de especificidad observado en microorganismos frente a distintas moléculas con grupos fosfonato (White & Metcalf, 1943; Wackett et al., 1987; Parker et al., 1999; Fox & Mendz, 2006).

*Rhizobium* sp. P44RR-XXIV posee una copia del gen *AcdS* que codifica para la enzima ACC-desaminasa (1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase, EC 3.5.99.7). Junto a la secuencia de *AcdS*, se encontró en la región 5' también un homólogo del regulador *AcdR*. La regulación de la síntesis de ACC-desaminasa no depende simplemente de este gen regulador, y no está descrita en el género.

En otro miembro cercano de la familia *Rhizobiaceae*, *Mesorhizobium* spp. el mecanismo de regulación propuesto involucra los genes *nifA*<sub>1</sub> y *nifA*<sub>2</sub>, estando *AcdR* ausente (Singh et al., 2015).

Se investigó también la presencia de homólogos involucrados en las diferentes rutas hasta ahora conocidas de síntesis de Ácido indolacético (AIA). Se encontraron homólogos del gen de aldehído deshidrogenasa, *AldA* (ruta del indol-3-piruvato), homólogos de los genes de nitrilasa y nitrilo hidratasa, *nit4* y *nthAB* (ruta del indol-3-acetonitrilo/indol-3-acetamida), y un probable homólogo de indolacetamida hidrolasa, *iaaH* (ruta de indol-3-acetamida).

Para la adquisición y metabolismo de fósforo, el resultado de la anotación en RAST entrega un total de 87 posibles genes, los cuales están relacionados con el transportador de fosfatos de alta afinidad y control del regulón PHO, metabolismo del fosfato (incluyendo dos homólogos de la fosfatasa alcalina), metabolismo de polifosfatos (incluidos los genes de los dos operones *phn*) y de alquilfosfonatos.

La absorción de hierro es llevada a cabo a través de varios transportadores, como ABC pitA, pitD, pitC y el sistema hierro-B12-sideróforo-hemina. Si bien se encontraron genes relacionados con la síntesis del sideróforo *Aerobactin*, al igual que P6BS-III, no estarían presentes la totalidad de genes necesarios para la biosíntesis de esta molécula.

Curiosamente, *Rhizobium* sp. P44RR-XXIV no posee homólogos de genes relacionados con la fijación biológica de nitrógeno (genes *nif*), ni factores de nodulación NOD (genes *nod*). Eso indicaría a priori que la cepa no es capaz de formar una asociación simbiótica con *Lotus* mediante la formación de nódulos. Este hallazgo ya ha sido documentado recientemente en *Rhizobiaceae*, y es tema de gran interés en la comunidad científica, ya que se desconoce cuál es el rol ecológico que estos saprófitos desempeñan en la rizosfera (Giraud et al., 2007; Jones et al., 2016; Okazaki et al., 2016). Existe también la posibilidad de que durante el procedimiento de enriquecimiento, la presión de selección ejercida sobre la cepa haya provocado la pérdida del plásmido de simbiosis (*Sym*) (López-Guerrero et al., 2012).

Si bien esta observación es un hallazgo que no entorpece en absoluto la estrategia de remediación para la que el microorganismo fue pensado, por pertenecer P44RR-XXIV al género *Rhizobium* y encontrarse filogenéticamente muy cercano a *R. rhizogenes*, conocido fitopatógeno (Ream, 2009), se realizaron estudios adicionales antes de continuar con ensayos de interacción planta-microorganismo. Anteriormente, aquellos miembros patogénicos se agrupaban bajo el género *Agrobacterium*, mientras que los miembros relacionados con la promoción del crecimiento vegetal eran parte del género



*Rhizobium*. En la actualidad, la nomenclatura tiende a unificar estos dos grupos bajo el género único *Rhizobium* y nombrar a los patógenos como “grupo *Agrobacterium*” (Young et al., 2003).

Vale la pena además mencionar que *Rhizobium* sp. AC27/96, cuyo genoma presenta mayor similitud al de P44RR-XXIV, no cuenta con una publicación que detalle cómo fue aislado e identificado, aunque es considerado como inocuo y no fitopatógeno de acuerdo con Davis II y colaboradores (Davis II et al., 2016) en un estudio bioinformático llevado a cabo específicamente para definir esta cualidad. En dicha publicación se desarrolla una herramienta bioinformática para la investigación de genomas causantes de la enfermedad tumoral llamada “*gall disease*”, ocasionada, entre otros microorganismos, por *A. tumefaciens*. Posiblemente se haya incluido a AC27/96 ya que posee como vecino más cercano, de acuerdo con la ribotipificación a *R. rhizogenes* NBRC 13257.

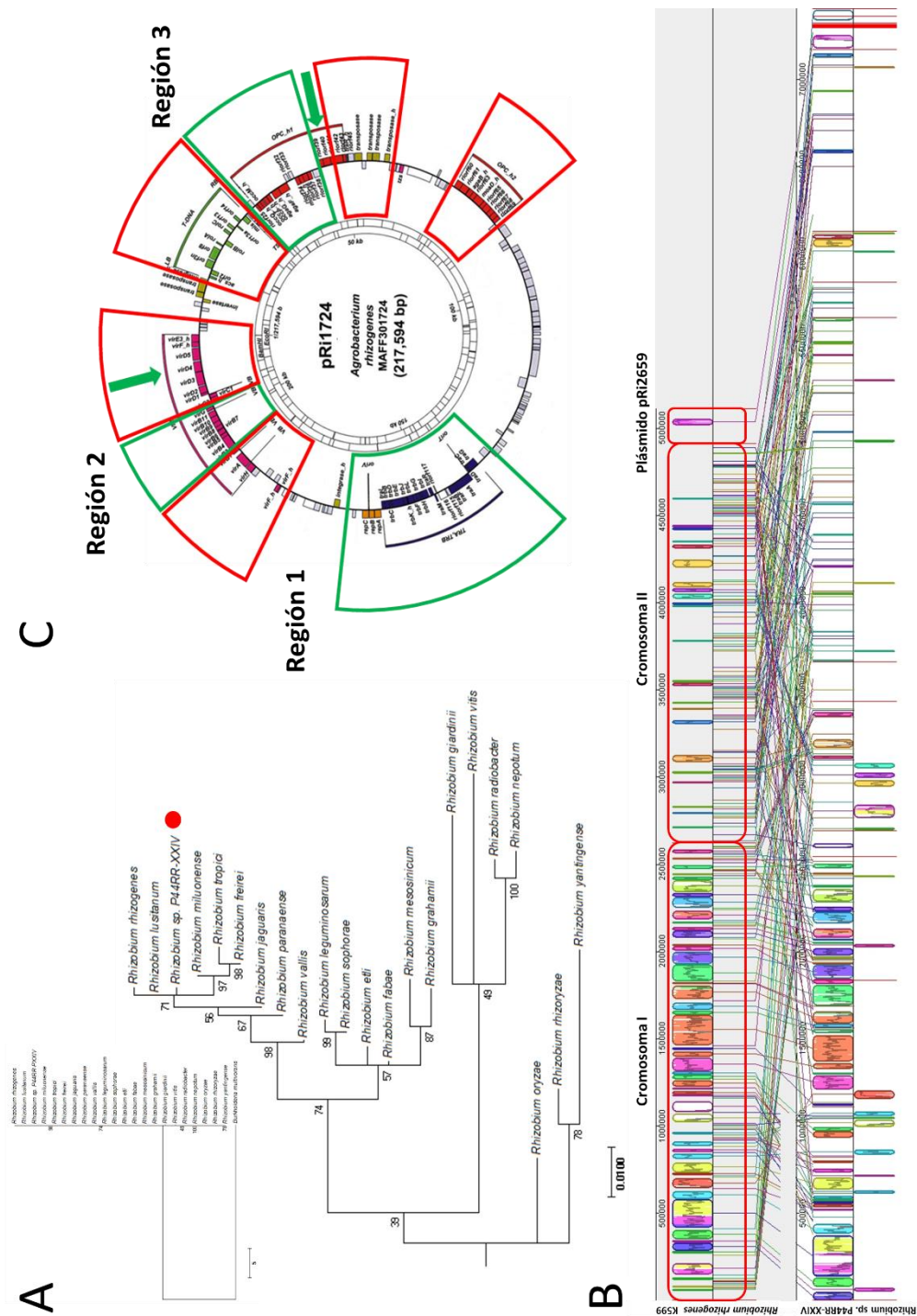
El análisis filogenético mediante el fragmento completo del gen del ARNr 16S, junto con la identificación mediante genoma completo (Figura 5.15A y tabla 5.9) confirman que el *Agrobacterium* más cercano a P44RR-XXIV es efectivamente *R. rhizogenes*, microorganismo que causa la enfermedad de “raíces peludas” o mejor conocida en idioma inglés como “*hairy root disease*”. La capacidad de provocar dicha enfermedad radica en la portación del plásmido Ri (Hodges et al., 2006).

Se comparó entonces el genoma de *R. rhizogenes* K599 (genoma de referencia) con el de *R. sp.* P44RR-XXIV utilizando Mauve, así como se hizo anteriormente con los genomas de los microorganismos filogenéticamente más cercanos (Figura 5.11B). El grupo *Agrobacterium* se caracteriza por presentar dos cromosomas (uno linear y otro circular) por lo que sería esperable encontrarnos con una gran cantidad de regiones del genoma de P44RR-XXIV representadas en los dos cromosomas de *R. rhizogenes* de ser P44RR-XXIV más cercano al grupo *Agrobacterium* que al grupo *Rhizobium*. En la comparación (Figura 5.15B) se observa que son varias las regiones que presentan sintenia en el cromosoma I, si bien muestran una menor extensión y cantidad que los genomas comparados en la figura 5.11B, pudiéndose ver también una mayor cantidad de inversiones. Esto parecería indicar que P44RR-XXIV posee más similitud al cromosoma de *Rhizobium* que al cromosoma I de *Agrobacterium*. En cuanto al cromosoma II, podemos observar poco grado de sintenia entre éste y los distintos *contigs* del genoma de P44RR-XXIV. Esto nos permite concluir que, en cuanto a las regiones cromosómicas, P44RR-XXIV es más similar al grupo *Rhizobium*.

Para estudiar la posible presencia de un plásmido Ri, se buscaron homólogos en el genoma de P44RR-XXIV de cada uno de los genes presentes en el plásmido pRi1724 perteneciente a *R. rhizogenes* MAFF301724 (Moriguchi et al., 2001), y cuya presencia en dicha cepa la convierte en patógena. El resultado de esta búsqueda, representado en la figura 5.15C, muestra que no existen secuencias

homólogas para aquellos genes relacionados con el T-DNA, síntesis de opinas “*ocp\_h2*” y genes *virA*, *virH*, *virF*, y gran parte de los genes *VirD*. Se encontraron homólogos de genes presentes en tres regiones distintas del plásmido, las cuales se identifican en la figura 5.15C como Región 1, presente en el *contig* 10 (124.257 pb) y que corresponde a la región de sintenia observada para el plásmido pRi2659 en la figura 5.15B, la región 2, localizada en el *contig* 9 (150.008 pb) y que también incluye el homólogo de *virD4* y la región 3, presente en el *contig* 1 (1.976.191 pb) y en donde los homólogos de *agaG*, *agaF*, *riorf32* y *riorf33* están asociados a un locus de síntesis de aminos biógenas, separados al resto de los genes de síntesis de opinas.

La ausencia de homólogos para genes *rol*, junto con la de aquellos necesarios para la síntesis completa de algún tipo particular de opina (*virD1*, *virD2* o genes del grupo *virE*), sumado a que las regiones que presentan homología corresponden a diferentes *contigs* dentro del genoma de P44RR-XXIV, indicaría la ausencia de un plásmido Ri en P44RR-XXIV, o por lo menos, que no es funcional (Ream, 2009).



**Figura 5.15.** Estudio comparativo entre *Rhizobium* sp. P44RR-XXIV y *R. rhizogenes* K599. A. Árbol filogenético realizado con las *type strains* del género *Rhizobium*. El alineamiento múltiple de secuencias fue realizado utilizando el algoritmo *Muscle*, y el árbol filogenético se obtuvo mediante el método *Maximum Likelihood* con 1000 iteraciones (bootstraps) en el software MEGA versión 7.0. B. Alineamiento del genoma de P44RR-XXIV frente al de *R. rhizogenes* K599 utilizando Mauve. C. Resultados del BLAST de los péptidos presentes en el plásmido Ri en el genoma de P44RR-XXIV, en donde las ausencias o resultados negativos se muestran en rojo y las presencias o resultados positivos se muestran en verde (para más información, remitirse al texto).

## 5.4 Conclusiones

A partir del aislamiento de microorganismos cultivables propuesto en el capítulo 4, se logró obtener un banco de cepas puras, las cuales fueron evaluadas a lo largo de este capítulo tanto por su tolerancia y degradación a glifosato como por distintas capacidades de promoción de crecimiento vegetal, pero también por aspectos que tienen que ver con escalado y uso industrial, cumplimentando entonces el objetivo particular central de este capítulo referido a la caracterización genotípica y fenotípica de estos microorganismos (objetivo particular 4) y a su posterior evaluación de las capacidades de promoción de crecimiento de vegetal (objetivo particular 5).

A lo largo de todo el proceso de caracterización se prestó atención a aspectos como la preservación de las cepas, el uso de sustratos simples, la producción de una alta cantidad de biomasa, el alto número de UFC mL<sup>-1</sup> y a grandes rasgos, una fácil manipulación. Esta perspectiva, que refiere al uso y a la aplicación del microorganismo en distintos procesos industriales, generalmente queda relegada en los distintos trabajos de aislamiento de microorganismos tolerantes a glifosato, desviando muchas veces el trabajo experimental de cualquier tipo de aplicación tecnológica como finalidad última.

Se dispone entonces de un conjunto de cepas proveniente tanto de suelos pastoriles como de rizosfera de *L. tenuis* crónicamente expuestos a glifosato, las cuales pertenecen casi en su totalidad al orden de las *Rhizobiales*, hecho aparenemente fortuito, ya que existen innumerables reportes de microorganismos capaces de generar interacciones benéficas con especies vegetales.

La totalidad de estos aislamientos cumple con los prerequisites necesarios propuestos para llevar a cabo estudios posteriores en sistemas experimentales más complejos que permitan proponer una combinación planta-bacteria idónea para la rizadorremediación de suelos pampeanos:

- Tolerancia mayor, en varios órdenes de magnitud, a la máxima concentración en suelo reportada. Esto aseguraría su supervivencia también frente a posibles exposiciones “agudas”. Con esta información, y conociendo su origen filogenético podemos también proponer en un futuro ensayos de inoculación en especies vegetales que estén directamente emplazadas en el lote productivo, como ser la soja (*Glicine max*) o alfalfa (*Medicago sativa*), la oleaginosa y forrajera por excelencia en el país, respectivamente. A partir de los resultados del ensayo de tolerancia en placa se observa también que el género *Rhizobium* poseen una sensibilidad muy variable a glifosato (de 500 a 10,000 mg kg<sup>-1</sup>), por lo que surge entonces una necesidad futura de estudiar cada una de

las secuencias de la EPSP sintasa, ya que las diferencias estructurales de la enzima dentro de este grupo posiblemente aporten información acerca de nuevas regiones relevantes implicadas en la conservación de la actividad catalítica y tolerancia. Es así como la secuencia de P44RR-XXIV, si bien pertenece a las enzimas Clase I, es altamente tolerante. Futuros hallazgos podrían romper con el paradigma actual, que agrupa a las enzimas Clase I y Clase II como las sensibles y tolerantes, respectivamente.

- La utilización del glifosato como única fuente de fósforo, fundamental en suelos con muy bajo contenido de fósforo biodisponible, y en donde el uso de esta fuente alternativa podría resultar una ventaja adaptativa cuando existe cronicidad en la exposición.
- Distintas capacidades de promoción de crecimiento vegetal *in vitro*. Todas las cepas estudiadas presentan al menos tres resultados positivos en los distintos test estudiados. Destacan particularmente la solubilización de distintas formas de fósforos insolubles, correlacionándose con los niveles de fósforo disponible medidos. Contar con cepas que poseen más de una capacidad de promoción alienta a continuar con los estudios de interacción *in vivo*.

Por último, se realizó la secuenciación del genoma completo de dos de las cepas que presentaron excelentes resultados en todos los ensayos realizados, *Ochrobactrum* sp. P6BS-III y *Rhizobium* sp. P44RR-XXIV, permitiendo al grupo adquirir nuevas capacidades en el campo de la genómica y cumplimentando el objetivo particular 7.

Generar nuevos recursos genómicos a partir de microorganismos cuyo genoma no ha sido secuenciado, o bien no estudiado en profundidad, permite contribuir al conocimiento de sus respectivos géneros, como ocurrió con estos dos genomas, uno de los cuales no ha sido anteriormente secuenciado y el otro se encuentra pobremente descrito.

La secuenciación de genomas completos es una herramienta (ahora) fundamental para futuros ensayos de interacción planta-microorganismo, en donde múltiples posibilidades pueden determinar una interacción positiva y posterior establecimiento del microorganismo en la rizosfera. Si bien se exploraron tests muy relevantes de promoción de crecimiento vegetal, existen otros mecanismos que no han sido fenotípicamente probados pero que, estudiando secuencias homólogas responsables de estos mecanismos en el genoma, puede dar lugar a nueva experimentación para corroborarlos.

El uso de diferentes aproximaciones metodológicas de comparación *in silico* genoma a genoma permitió obtener información complementaria respecto a la estructura del genoma de *Rhizobium* sp. P44RR-XXIV, dando no solamente una idea de la similitud global de nucleótidos, sino también

permitiendo identificar regiones de alta homología de secuencia y de no homología, y a la posible estructura genómica a la cual pertenecen. A la vez, el genoma de *Ochrobactrum* sp. P6BS-III aportó una gran cantidad de genes al pool génico del género, y que a su vez muchos de ellos no poseen función conocida.

## 5.5 Referencias

- Abraham, J., and Silambarasan, S. (2016). Biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolysis product 3,5,6-trichloro-2-pyridinol using a novel bacterium *Ochrobactrum* sp. JAS2: A proposal of its metabolic pathway. *Pestic. Biochem. Physiol.* 126, 13–21. doi:10.1016/j.pestbp.2015.07.001.
- Ahemad, M., and Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *J. King Saud Univ. - Sci.* 26, 1–20. doi:10.1016/j.jksus.2013.05.001.
- Alikhan, N.-F., Petty, N. K., Ben Zakour, N. L., and Beatson, S. A. (2011). BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons. *BMC Genomics* 12, 402. doi:10.1186/1471-2164-12-402.
- An, R., and Moe, L. A. (2016). Regulation of PQQ-dependent glucose dehydrogenase activity in the model rhizosphere dwelling bacterium *Pseudomonas putida* KT2440. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, AEM.00813-16. doi:10.1128/AEM.00813-16.
- Arndt, D., Grant, J. R., Marcu, A., Sajed, T., Pon, A., Liang, Y., et al. (2016). PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res.* 44, W16–W21. doi:10.1093/nar/gkw387.
- Aujoulat, F., Romano-Bertrand, S., Masnou, A., Marchandin, H., and Jumas-Bilak, E. (2014). Niches, population structure and genome reduction in *Ochrobactrum* intermedium: Clues to technology-driven emergence of pathogens. *PLoS One* 9. doi:10.1371/journal.pone.0083376.
- Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., et al. (2008). The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics* 9, 75. doi:10.1186/1471-2164-9-75.
- Bailly, A., and Weisskopf, L. (2012). Current knowledge and future challenges Do not distribute . Do not distribute . *Plant Signal. Behav.* 7, 1–7.
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., et al. (2012). SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *J. Comput. Biol.* 19, 455–477. doi:10.1089/cmb.2012.0021.
- Barry, S. M., and Challis, G. L. (2009). Recent advances in siderophore biosynthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13, 205–215. doi:10.1016/j.cbpa.2009.03.008.

- Bashan, Y. (1998). Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnol. Adv.* 16, 729–770. doi:10.1016/S0734-9750(98)00003-2.
- Belimov, A.A., Hontzeas, N., Safronova, V.I., Demchinskaya, S.V., Piluzza, G., Bullitta, S., and Glick, B. R. (2005). Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.). *Soil Biol. Biochem.* 37, 241–250. doi:https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.07.033.
- Bertani, G. (1951). Studies on Lysogenesis I. The mode of phageliberation by lysogenic eschericia coli. *J. Bacteriol.* 62, 293–300. doi:citeulike-article-id:149214.
- Caspi, R., Billington, R., Ferrer, L., Foerster, H., Fulcher, C. A., Keseler, I. M., et al. (2016). The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases. *Nucleic Acids Res.* 44, D471–D480. doi:10.1093/nar/gkv1164.
- Castle, L. A. (2004). Discovery and Directed Evolution of a Glyphosate Tolerance Gene. *Science* (80-. ). 304, 1151–1154. doi:10.1126/science.1096770.
- Chakraborty, U., Chakraborty, B. N., Basnet, M., and Chakraborty, A. P. (2009). Evaluation of *Ochrobactrum anthropi* TRS-2 and its talc based formulation for enhancement of growth of tea plants and management of brown root rot disease. *J. Appl. Microbiol.* 107, 625–634. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04242.x.
- Chaudhari, N. M., Gupta, V. K., and Dutta, C. (2016). BPGA- an ultra-fast pan-genome analysis pipeline. *Sci. Rep.* 6, 24373. doi:10.1038/srep24373.
- Chudasama, K. S., and Thaker, V. S. (2017). Genome sequence of *Ochrobactrum anthropi* strain SUBG007, a plant pathogen and potential xenobiotic compounds degradation bacterium. *Genomics Data* 11, 116–117. doi:10.1016/j.gdata.2017.01.001.
- Cockerill, F. R., Wilker, M. A., Alder, J., Dudley, M. N., Eliopoulos, G. M., Ferraro, M. J., et al. (2012). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically ; Approved Standard — Ninth Edition. Wayne, PA.
- Cole, J. R., Wang, Q., Fish, J. A., Chai, B., McGarrell, D. M., Sun, Y., et al. (2014). Ribosomal Database Project: Data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 42, 633–642. doi:10.1093/nar/gkt1244.
- Cuadrado, V. (2009). Estudios de rizorremediación de suelos contaminados con herbicidas organoclorados.



- Cunningham, J. E., and Kuiack, C. (1992). Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 1451–1458.
- Davis II, E. W., Weisberg, A. J., Tabima, J. F., Grunwald, N. J., and Chang, J. H. (2016). Gall-ID: tools for genotyping gall-causing phytopathogenic bacteria. *PeerJ* 4, e2222. doi:10.7717/peerj.2222.
- de Garcia Salamone, I. E., Hynes, R. K., and Nelson, L. M. (2006). “Role of Cytokinins in Plant Growth Promotion by Rhizosphere Bacteria,” in *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*, ed. Z. A. Siddiqui (Dordrecht: Springer Netherlands), 173–195. doi:10.1007/1-4020-4152-7\_6.
- De Las Nieves Rodríguez Mendoza, M., Chávez, R. S. M., Cué, J. L. G., and Mendoza, A. B. (2013). Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en el cultivo de melón (*Cucumis Melo*). *Interciencia* 38, 857–862.
- Derichs, J., Kämpfer, P., and Lipski, A. (2014). *Pedobacter nutrimenti* sp. nov., isolated from chilled food. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 1310–1316. doi:10.1099/ij.s.0.058677-0.
- Dinesh, R., Anandaraj, M., Kumar, A., Bini, Y. K., Subila, K. P., and Aravind, R. (2015). Isolation, characterization, and evaluation of multi-trait plant growth promoting rhizobacteria for their growth promoting and disease suppressing effects on ginger. *Microbiol. Res.* 173, 34–43. doi:10.1016/j.micres.2015.01.014.
- Duan, J., Müller, K. M., Charles, T. C., Vesely, S., and Glick, B. R. (2009). 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase genes in rhizobia from southern saskatchewan. *Microb. Ecol.* 57, 423–436. doi:10.1007/s00248-008-9407-6.
- Duca, D., Lorv, J., Patten, C. L., Rose, D., and Glick, B. R. (2014). Indole-3-acetic acid in plant–microbe interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek* 106, 85–125. doi:10.1007/s10482-013-0095-y.
- Dugardeyn, J., and Van Der Straeten, D. (2008). Ethylene: Fine-tuning plant growth and development by stimulation and inhibition of elongation. *Plant Sci.* 175, 59–70. doi:10.1016/j.plantsci.2008.02.003.
- Edgar, R. C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26, 2460–2461. doi:10.1093/bioinformatics/btq461.
- Edwards, D. J., and Holt, K. E. (2013). Beginner’s guide to comparative bacterial genome analysis using next-generation sequence data. *Microb. Inform. Exp.* 3, 2. doi:10.1186/2042-5783-3-2.
- Ermakova, I. T., Shushkova, T. V., and Leont’evskii, a. a. (2008). Microbial degradation of organophosphonates by soil bacteria. *Microbiology* 77, 615–620.

doi:10.1134/S0026261708050160.

- Faisal, M. (2013). Inoculation of Plant Growth Promoting Bacteria *Ochrobactrum intermedium*, *Brevibacterium* sp. and *Bacillus cereus* Induce Plant Growth Parameters. *J. Appl. Biotechnol.* 1, 45–53. doi:10.5296/jab.v1i1.3698.
- Fan, J., Yang, G., Zhao, H., Shi, G., Geng, Y., Hou, T., et al. (2012). Isolation, identification and characterization of a glyphosate-degrading bacterium, *Bacillus cereus* CB4, from soil. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 58, 263–271. doi:10.2323/jgam.58.263.
- Finan, T. M., Weidner, S., Wong, K., Buhrmester, J., Chain, P., Vorholter, F. J., et al. (2001). The complete sequence of the 1,683-kb pSymB megaplasmid from the N<sub>2</sub>-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 9889–9894. doi:10.1073/pnas.161294698.
- Finn, R. D., Clements, J., Arndt, W., Miller, B. L., Wheeler, T. J., Schreiber, F., et al. (2015). HMMER web server: 2015 Update. *Nucleic Acids Res.* 43, W30–W38. doi:10.1093/nar/gkv397.
- Firdous, S., Iqbal, S., Anwar, S., and Jabeen, H. Identification and analysis of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) gene from glyphosate-resistant *Ochrobactrum intermedium* Sq20. *Pest Manag. Sci.*, n/a--n/a. doi:10.1002/ps.4624.
- Forlani, G., Mangiagalli, a, Nielsen, E., and Suardi, C. . (1999). Degradation of the phosphonate herbicide glyphosate in soil: evidence for a possible involvement of unculturable microorganisms. *Soil Biol. Biochem.* 31, 991–997. doi:10.1016/S0038-0717(99)00010-3.
- Fox, E. M., and Mendz, G. L. (2006). Phosphonate degradation in microorganisms. *Enzyme Microb. Technol.* 40, 145–150. doi:10.1016/j.enzmictec.2005.10.047.
- Funke, T., Yang, Y., Han, H., Healy-Fried, M., Olesen, S., Becker, A., et al. (2009). Structural basis of glyphosate resistance resulting from the double mutation Thr97 ??? Ile and Pro101 ??? Ser in 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 284, 9854–9860. doi:10.1074/jbc.M809771200.
- Gerhardt, K. E., Gerwing, P. D., and Greenberg, B. M. (2017). Opinion: Taking phytoremediation from proven technology to accepted practice. *Plant Sci.* 256, 170–185. doi:10.1016/j.plantsci.2016.11.016.
- Giraud, E., Moulin, L., Vallenet, D., Barbe, V., Cytryn, E., Avarre, J. C., et al. (2007). Legumes symbioses: Absence of Nod genes in photosynthetic bradyrhizobia. *Science (80-. )*. 316, 1307–1312. doi:10.1126/science.1139548.

- Gkorezis, P., Van Hamme, J. D., Bottos, E. M., Thijs, S., Balseiro-Romero, M., Monterroso, C., et al. (2016). Draft Genome Sequence of *Pantoea ananatis* GB1, a Plant-Growth-Promoting Hydrocarbonoclastic Root Endophyte, Isolated at a Diesel Fuel Phytoremediation Site Planted with *Populus*. *Genome Announc.* 4, e00028-16. doi:10.1128/genomeA.00028-16.
- Glick, B. (2003). Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnol. Adv.* 21, 383–393. doi:10.1016/S0734-9750(03)00055-7.
- Glick, B. R. (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiol. Res.* 169, 30–39. doi:10.1016/j.micres.2013.09.009.
- Glick, B. R., and Glick, B. R. (2012). Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Scientifica (Cairo)*. 2012, 1–15. doi:10.6064/2012/963401.
- Guo, B., Guo, Y., Hong, H., Jin, L., Zhang, L., Chang, R.-Z., et al. (2015). Co-expression of G2-EPSPS and glyphosate acetyltransferase GAT genes conferring high tolerance to glyphosate in soybean. *Front. Plant Sci.* 6, 1–11. doi:10.3389/fpls.2015.00847.
- Han, J., Tian, Y. S., Xu, J., Wang, L. J., Wang, B., Peng, R. H., et al. (2014). Functional characterization of *aroA* from *Rhizobium leguminosarum* with significant glyphosate tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 1162–1169. doi:10.4014/jmb.1312.12076.
- Heldal, M., Norland, S., Fagerbakke, K. M., Thingstad, F., and Bratbak, G. (1997). The elemental composition of bacteria: A signature of growth conditions? *Mar. Pollut. Bull.* 33, 3–9. doi:10.1016/S0025-326X(97)00007-6.
- Hider, R. C., and Kong, X. (2010). Chemistry and biology of siderophores. *Nat. Prod. Rep.* 27, 637. doi:10.1039/b906679a.
- Hodges, L. D., Vergunst, A. C., Neal-McKinney, J., Den Dulk-Ras, A., Moyer, D. M., Hooykaas, P. J. J., et al. (2006). *Agrobacterium rhizogenes* GALLS protein contains domains for ATP binding, nuclear localization, and type IV secretion. *J. Bacteriol.* 188, 8222–8230. doi:10.1128/JB.00747-06.
- Hove-Jensen, B., Zechel, D. L., and Jochimsen, B. (2014). Utilization of Glyphosate as Phosphate Source: Biochemistry and Genetics of Bacterial Carbon-Phosphorus Lyase. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 78, 176–197. doi:10.1128/MMBR.00040-13.
- Huang, Y., Niu, B., Gao, Y., Fu, L., and Li, W. (2010). CD-HIT Suite: A web server for clustering and comparing biological sequences. *Bioinformatics* 26, 680–682. doi:10.1093/bioinformatics/btq003.

- Huerta-Cepas, J., Forslund, K., Szklarczyk, D., Jensen, L. J., von Mering, C., and Bork, P. (2016). Fast genome-wide functional annotation through orthology assignment by eggNOG-mapper. *bioRxiv*. doi:10.1101/076331.
- Jones, F. P., Clark, I. M., King, R., Shaw, L. J., Woodward, M. J., and Hirsch, P. R. (2016). Novel European free-living, non-diazotrophic Bradyrhizobium isolates from contrasting soils that lack nodulation and nitrogen fixation genes – a genome comparison. *Sci. Rep.* 6, 25858. doi:10.1038/srep25858.
- Jorquera, M. A., Hernández, M. T., Rengel, Z., Marschner, P., and de la Luz Mora, M. (2008). Isolation of culturable phosphobacteria with both phytate-mineralization and phosphate-solubilization activity from the rhizosphere of plants grown in a volcanic soil. *Biol. Fertil. Soils* 44, 1025. doi:10.1007/s00374-008-0288-0.
- Kampfer, P., Scholz, H. C., Huber, B., Falsen, E., and Busse, H.-J. (2007). *Ochrobactrum haematophilum* sp. nov. and *Ochrobactrum pseudogrignonense* sp. nov., isolated from human clinical specimens. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 2513–2518. doi:10.1099/ijs.0.65066-0.
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Asamizu, E., Kato, T., Sasamoto, S., et al. (2000). Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res.* 7, 381–406. doi:10.1093/dnares/7.6.331.
- Karnwal, A. (2017). Isolation and identification of plant growth promoting rhizobacteria from maize (*Zea mays* L.) rhizosphere and their plant growth promoting effect on rice (*Oryza sativa* L.). *J. Plant Prot. Res.* 57, 144–151. doi:10.1515/jppr-2017-0020.
- Khan, M. S., Zaidi, A., and Musarrat, J. (2009). Microbial strategies for crop improvement. *Microb. Strateg. Crop Improv.*, 1–358. doi:10.1007/978-3-642-01979-1.
- Kiliç, N. K. (2009). Enhancement of phenol biodegradation by *Ochrobactrum* sp. isolated from industrial wastewaters. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 63, 778–781. doi:10.1016/j.ibiod.2009.06.006.
- Kim, B. K., Lim, Y.-W., Kim, M., Kim, S., Chun, J., Lee, J.-H., et al. (2007). EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 2259–2261. doi:10.1099/ijs.0.64915-0.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., and Sonnhammer, E. L. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes<sup>11</sup>Edited by F. Cohen. *J. Mol. Biol.* 305, 567–580. doi:10.1006/jmbi.2000.4315.
- Kryuchkova, Y. V., Burygin, G. L., Gogoleva, N. E., Gogolev, Y. V., Chernyshova, M. P., Makarov, O. E., et

- al. (2014). Isolation and characterization of a glyphosate-degrading rhizosphere strain, *Enterobacter cloacae* K7. *Microbiol. Res.* 169, 99–105. doi:10.1016/j.micres.2013.03.002.
- Kuiper, I., Lagendijk, E. L., Bloemberg, G. V, and Lugtenberg, B. J. J. (2004). Rhizoremediation : A Beneficial Plant-Microbe Interaction Bioremediation : A natural method. *Society* 17, 6–15.
- Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870–1874. doi:10.1093/molbev/msw054.
- Li, L., Lu, W., Han, Y., Ping, S., Zhang, W., Chen, M., et al. (2009). A novel RPMXR motif among class II 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthases is required for enzymatic activity and glyphosate resistance. *J. Biotechnol.* 144, 330–336. doi:10.1016/j.jbiotec.2009.09.014.
- Liu, C.-M., McLean, P. a, Sookdeo, C. C., and Cannon, F. C. (1991). Degradation of the Herbicide Glyphosate by Members of the Family Rhizobiaceae. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 1799–1804. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=183471&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- López-Guerrero, M. G., Ormeño-Orrillo, E., Acosta, J. L., Mendoza-Vargas, A., Rogel, M. A., Ramírez, M. A., et al. (2012). Rhizobial extrachromosomal replicon variability, stability and expression in natural niches. *Plasmid* 68, 149–158. doi:10.1016/j.plasmid.2012.07.002.
- Mantelin, S., Fischer-Le Saux, M., Zakhia, F., Béna, G., Bonneau, S., Jeder, H., et al. (2006). Emended description of the genus *Phyllobacterium* and description of four novel species associated with plant roots: *Phyllobacterium bourgognense* sp. nov., *Phyllobacterium ifriqiyense* sp. nov., *Phyllobacterium leguminum* sp. nov. and *Phyllobacterium brassic.* *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 827–839. doi:10.1099/ijs.0.63911-0.
- Meier-Kolthoff, J. P., Auch, A. F., Klenk, H.-P., and Göker, M. (2013). Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics* 14, 60. doi:10.1186/1471-2105-14-60.
- Moriguchi, K., Maeda, Y., Satou, M., Hardayani, N. S. N., Kataoka, M., Tanaka, N., et al. (2001). The complete nucleotide sequence of a plant root-inducing (Ri) plasmid indicates its chimeric structure and evolutionary relationship between tumor-inducing (Ti) and symbiotic (Sym) plasmids in Rhizobiaceae. *J. Mol. Biol.* 307, 771–784. doi:10.1006/jmbi.2001.4488.
- Murphy J, and Riley JP (1962). A MODIFIED SINGLE SOLUTION METHOD FOR THE DETERMrNATION OF PHOSPHATE IN NATURAL WATERS. *Anal. Chem. ACTA* 27, 31–36. doi:10.1016/S0003-

2670(00)88444-5.

- Nautiyal, C. S. (1999). An eficiente microbiological growth médium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 170, 265–270.
- Okazaki, S., Tittabutr, P., Teulet, A., Thouin, J., Fardoux, J., Chaintreuil, C., et al. (2016). Rhizobium-legume symbiosis in the absence of Nod factors: Two possible scenarios with or without the T3SS. *ISME J.* 10, 64–74. doi:10.1038/ismej.2015.103.
- Oteino, N., Lally, R. D., Kiwanuka, S., Lloyd, A., Ryan, D., Germaine, K. J., et al. (2015). Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Front. Microbiol.* 6, 1–9. doi:10.3389/fmicb.2015.00745.
- Overbeek, R., Olson, R., Pusch, G. D., Olsen, G. J., Davis, J. J., Disz, T., et al. (2014). The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Res.* 42, 206–214. doi:10.1093/nar/gkt1226.
- Parker, G. F., Higgins, T. P., Hawkes, T., and Robson, R. L. (1999). Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti phn genes: Characterization and identification of their protein products. *J. Bacteriol.* 181, 389–395.
- Patten, C. L., and Glick, B. R. (2002). Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3795–801. doi:10.1128/AEM.68.8.3795.
- Petersen, T. N., Brunak, S., Von Heijne, G., and Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: Discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods* 8, 785–786. doi:10.1038/nmeth.1701.
- Pipke, R., and Amrhein, N. (1988). Isolation and characterization of a mutant of *Arthrobacter* sp. Strain GLP-1 Which utilizes the herbicide glyphosate as its sole source of phosphorus and nitrogen. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2868–2870. Available at: <http://aem.asm.org/content/54/11/2868.abstract>.
- Pollegioni, L., Schonbrunn, E., and Siehl, D. (2011). Molecular basis of glyphosate resistance - Different approaches through protein engineering. *FEBS J.* 278, 2753–2766. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08214.x.
- Ramirez-Bahena, M. H., Nesme, X., and Muller, D. (2012). Rapid and simultaneous detection of linear chromosome and large plasmids in Proteobacteria. *J. Basic Microbiol.* 52, 736–739. doi:10.1002/jobm.201100278.
- Ream, W. (2009). *Agrobacterium tumefaciens* and *A. rhizogenes* use different proteins to transport

- bacterial DNA into the plant cell nucleus. *Microb. Biotechnol.* 2, 416–427. doi:10.1111/j.1751-7915.2009.00104.x.
- Richter, M., Rosselló-Móra, R., Oliver Glöckner, F., and Peplies, J. (2015). JSpeciesWS: A web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. *Bioinformatics* 32, 929–931. doi:10.1093/bioinformatics/btv681.
- Rissman, A. I., Mau, B., Biehl, B. S., Darling, A. E., Glasner, J. D., and Perna, N. T. (2009). Reordering contigs of draft genomes using the Mauve Aligner. *Bioinformatics* 25, 2071–2073. doi:10.1093/bioinformatics/btp356.
- Romick, T. L., and Fleming, H. P. (1998). Acetoin production as an indicator of growth and metabolic inhibition of *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Microbiol.* 84, 18–24. doi:10.1046/j.1365-2672.1997.00302.x.
- Sánchez, M., Bahena-Ramírez, M. H., Peix, A., Lorite, M. J., Sanjuán, J., Velázquez, E., et al. (2014). *Phyllobacterium loti* sp. nov. Isolated from nodules of *Lotus corniculatus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 781–786. doi:10.1099/ijs.0.052993-0.
- Schwyn, B., and Neilands, J. B. (1987). Universal assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* 160, 47–56. doi:https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9.
- Seweryn, P., Van, L. B., Kjeldgaard, M., Russo, C. J., Passmore, L. A., Hove-Jensen, B., et al. (2015). Structural insights into the bacterial carbon-phosphorus lyase machinery. *Nature* 525, 68–72. doi:10.1038/nature14683.
- Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H., and Gobi, T. A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: Sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *Springerplus* 2, 1–14. doi:10.1186/2193-1801-2-587.
- Shushkova, T. V., Ermakova, I. T., Sviridov, a. V., and Leontievsky, a. a. (2012). Biodegradation of glyphosate by soil bacteria: Optimization of cultivation and the method for active biomass storage. *Microbiology* 81, 44–50. doi:10.1134/S0026261712010134.
- Siehl, D. L., Castle, L. A., Gorton, R., and Keenan, R. J. (2007). The molecular basis of glyphosate resistance by an optimized microbial acetyltransferase. *J. Biol. Chem.* 282, 11446–11455. doi:10.1074/jbc.M610267200.
- Singh, R. P., Shelke, G. M., Kumar, A., and Jha, P. N. (2015). Biochemistry and genetics of ACC deaminase: A weapon to “stress ethylene” produced in plants. *Front. Microbiol.* 6, 1–14. doi:10.3389/fmicb.2015.00937.

- Spaepen, S., and Vanderleyden, J. (2011). Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, 1–13. doi:10.1101/cshperspect.a001438.
- Steinrücken, H. C., and Amrhein, N. (1980). The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 94, 1207–1212. doi:https://doi.org/10.1016/0006-291X(80)90547-1.
- Sviridov, A. V., Shushkova, T. V., Ermakova, I. T., Ivanova, E. V., Epiktetov, D. O., and Leont'evskii, A. A. (2015). Microbial Degradation of Glyphosate Herbicides (Review). *Прикладная Биохимия И Микробиология* 51, 183–190. doi:10.7868/S0555109915020221.
- Tahir, H. A. S., Gu, Q., Wu, H., Raza, W., Hanif, A., Wu, L., et al. (2017). Plant Growth Promotion by Volatile Organic Compounds Produced by *Bacillus subtilis* SYST2. *Front. Microbiol.* 8, 1–11. doi:10.3389/fmicb.2017.00171.
- Tatusova, T., Dicuccio, M., Badretdin, A., Chetvernin, V., Nawrocki, E. P., Zaslavsky, L., et al. (2016). NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Res.* 44, 6614–6624. doi:10.1093/nar/gkw569.
- Ternan, N. G., Grath, J. W. M., Mullan, G. M., and Quinn, J. P. (1998). Review : Organophosphonates : occurrence , synthesis and biodegradation by microorganisms. 14, 635–647.
- Tian, Y. S., Xiong, A. S., Xu, J., Zhao, W., Gao, F., Fu, X. Y., et al. (2010). Isolation from *Ochrobactrum anthropi* of a novel class II 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase with high tolerance to glyphosate. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 6001–6005. doi:10.1128/AEM.00770-10.
- Tian, Y. S., Xu, J., Xiong, A. S., Zhao, W., Fu, X. Y., Peng, R. H., et al. (2011). Improvement of glyphosate resistance through concurrent mutations in three amino acids of the *Ochrobactrum* 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 8409–8414. doi:10.1128/AEM.05271-11.
- Vallenet, D., Labarre, L., Rouy, Z., Barbe, V., Bocs, S., Cruveiller, S., et al. (2006). MaGe: A microbial genome annotation system supported by synteny results. *Nucleic Acids Res.* 34, 53–65. doi:10.1093/nar/gkj406.
- Valverde, A., Igual, J. M., Peix, A., Cervantes, E., and Velázquez, E. (2006). *Rhizobium lusitanum* sp. nov. a bacterium that nodulates *Phaseolus vulgaris*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 2631–2637. doi:10.1099/ijso.0.64402-0.
- Valverde, A., Velázquez, E., Fernández-Santos, F., Vizcaíno, N., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E., et al. (2005). *Phyllobacterium trifolii* sp. nov., nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. *Int.*



- J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 1985–1989. doi:10.1099/ijms.0.63551-0.
- Verma, S. C., Singh, A., Chowdhury, S. P., and Tripathi, A. K. (2004). Endophytic colonization ability of two deep-water rice endophytes, *Pantoea* sp. and *Ochrobactrum* sp. using green fluorescent protein reporter. *Biotechnol. Lett.* 26, 425–429. doi:10.1023/B:BILE.0000018263.94440.ab.
- Villarreal-Chiu, J. F., Quinn, J. P., and McGrath, J. W. (2012). The genes and enzymes of phosphonate metabolism by bacteria, and their distribution in the marine environment. *Front. Microbiol.* 3, 1–13. doi:10.3389/fmicb.2012.00019.
- Wackett, L. P., Shames, S. L., Venditti, C. P., and Walsh, C. T. (1987). Bacterial carbon-phosphorus lyase: Products, rates, and regulation of phosphonic and phosphinic acid metabolism. *J. Bacteriol.* 169, 710–717.
- White, A. K., and Metcalf, W. W. (1943). Two C O P Lyase Operons in *Pseudomonas stutzeri* and Their Roles in the Oxidation of Phosphonates , Phosphite , and Hypophosphite. 186, 4730–4739. doi:10.1128/JB.186.14.4730.
- Williams, T., and Kelley, C. (2011). Gnuplot 4.4. 1–225. Available at: [http://www.gnuplot.info/docs\\_4.4/gnuplot.pdf](http://www.gnuplot.info/docs_4.4/gnuplot.pdf).
- Yi, S., Cui, Y., Zhao, Y., Liu, Z., Lin, Y., and Zhou, F. (2016). A Novel Naturally Occurring Class I 5-Enolpyruvylshikimate-3-Phosphate Synthase from *Janibacter* sp. Confers High Glyphosate Tolerance to Rice. *Sci. Rep.* 6, 19104. doi:10.1038/srep19104.
- Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., et al. (2017). Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67, 1613–1617. doi:10.1099/ijsem.0.001755.
- Young, J. M., Kuykendall, L. D., Martínez-Romero, E., Kerr, A., and Sawada, H. (2003). Classification and nomenclature of *Agrobacterium* and *Rhizobium* - A reply to Farrand et al. (2003). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 1689–1695. doi:10.1099/ijms.0.02762-0.
- Zawadzka, A. M., Vandecasteele, F. P. J., Crawford, R. L., and Paszczynski, A. J. (2006). Identification of siderophores of *Pseudomonas stutzeri*. *Can. J. Microbiol.* 52, 1164–76. doi:10.1139/w06-077.
- Zhan, T., Zhang, K., Chen, Y., Lin, Y., Wu, G., Zhang, L., et al. (2013). Improving glyphosate oxidation activity of glycine oxidase from *Bacillus cereus* by directed evolution. *PLoS One* 8, 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0079175.

## S5.1 Material suplementario

### S5.1.1 Medio rico en nutrientes 869

Se utiliza de forma líquida y de forma sólida

Compuesto	Cantidad (g L <sup>-1</sup> )
Tryptona	10,0
Extracto de levadura	5,0
NaCl	5,0
D-(+) -Glucosa.H <sub>2</sub> O	1,0
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,345
Agar grado bacteriológico	15,0
pH: 7,0	

#### Referencia bibliográfica

Mergeay M, Nies D, Schlegel HG, Gerits M, Charles P, Van Gijsegem F (1985) *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. *Journal of Bacteriology* 162: 328-334.

### S5.1.2 Medio salino ACC-desaminasa

Compuesto	Cantidad (g L <sup>-1</sup> )
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,4
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,0
MgSO <sub>4</sub>	0,2
CaCl <sub>2</sub>	0,1
Glucosa	1,0
Sacarosa	1,0
Acetato de sodio	1,0
Citrato de sodio	1,0
Ácido málico	1,0
Manitol	1,0
FeSO <sub>4</sub>	0,005
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,002
ZnSO <sub>4</sub>	0,005
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,001
MnSO <sub>4</sub>	0,003
CoSO <sub>4</sub>	0,001
CuSO <sub>4</sub>	0,001
NiSO <sub>4</sub>	0,001
Ácido 1-Aminociclopropanocarboxílico	0,500

pH: 6,6

#### Referencia bibliográfica

Belimov AA, Hontzeas N, Safronova VI, Demchinskaya SV, Piluzza G, Bullitta S, Glick BR (2005) Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.). *Soil Biology & Biochemistry* 37: 241-250. doi: 10.1016/j.soilbio.2004.07.033.

#### S5.1.3 Medio MR VP (test de producción de acetoína)

Compuesto	Cantidad (g L <sup>-1</sup> )
Peptona	7,0
Glucosa	5,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,0
pH: 6,9	

#### Referencia bibliográfica

Voges O & Proskauer B, (1898) Beitrage zur Ernahrungsphysiologie und zur differential diagnose der Bakterien der hemmorrhagischen septicamie. *Zeit. fur Hyg.*, 28: 20-32.

#### S5.1.4 Medio de crecimiento NBRIP (test de solubilización de fosfato de calcio)

Compuesto	Cantidad (g L <sup>-1</sup> )
Glucosa	10,0
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	5,0
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	5,0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,25
KCl	0,2
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,1
Agar grado bacteriológico	15,0
pH: 7,0	

#### Referencia bibliográfica

Nautiyal CS (1999) An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS Microbiology Letters 170(1): 265-270.

### S5.1.5 Medio PSM (test de mineralización de fitatos)

Compuesto	Cantidad (g L <sup>-1</sup> )
Glucosa	10,0
Fitato de sodio	4,0
CaCl <sub>2</sub>	2,0
KCl	0,5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>	5,0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,01
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,01
Agar grado bacteriológico	15,0
pH:7,0	

#### Referencia bibliográfica

Jorquera MA, Hernandez MT, Rengel Z, Marschner P, Mora MD (2008) Isolation of culturable phosphobacteria with both phytate-mineralization and phosphate-solubilization activity from the rhizosphere of plants grown in a volcanic soil. *Biology and Fertility of Soils* 44: 1025-1034. doi: 10.1007/s00374-008-0288-0.

### S5.1.6 Medio ST (test de producción de ácidos orgánicos)

Compuesto	Cantidad (g L <sup>-1</sup> )
Sacarosa	20,0
Triptona	5,0
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,0002
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,002
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,0002
FeCl <sub>3</sub>	0,001
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,0002
ZnCl <sub>2</sub>	0,0028
pH:7,0	

#### Referencia bibliográfica

Cunningham JE, Kuiack C (1992) Production of Citric and Oxalic Acids and Solubilization of Calcium-Phosphate by *Penicillium-BILAII*. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 1451-1458.

### S5.1.7 Medio 284 (Test de producción de sideróforos)

Compuesto	Cantidad (g L <sup>-1</sup> )
Tris-HCl	6,06
NaCl	4,68
KCl	1,49
NH <sub>4</sub> Cl	1,07
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,43
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,2
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,03
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,04
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,144 mg
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,100 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,062 mg
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,190 mg
CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,017 mg
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,024 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,036 mg
Glucosa	0,52
Gluconato de sodio	0,66
Fructosa	0,54
Succinato de sodio	0,81



Ácido láctico

0,7 mL

Citrato de Fe(III)

0,066 mg (0,25  $\mu$ M)

0,797 mg (3,00  $\mu$ M)

pH: 7,0

#### Referencia bibliográfica

Schwyn B, Neilands JB (1987) UNIVERSAL CHEMICAL-ASSAY FOR THE DETECTION AND DETERMINATION OF SIDEROPHORES. Analytical Biochemistry 160: 47-56. doi: 10.1016/0003-2697(87)90612-9

**S5.1.8 Determinación de la concentración mínima inhibitoria de glifosato en agar. Resultados individuales**

Muestra de origen	Cepa	Concentración de glifosato (mg Kg <sup>-1</sup> / mM)								
		0 / 0	100 / 0,6	500 / 3,0	1.000 / 5,9	2.000 / 11,8	3.000 / 17,7	5.000 / 29,6	7.500 / 44,4	10.000 / 59,1
Rizosfera-rizoplana de <i>L. tenuis</i>	P8RR - IV									
	P4RR - V									
	P12RR - VI									
	P16RR - IX									
	P20RR - XI									
	P20RR - XII									
	P28RR - XV									
	P32RR - XVIII									
	P40RR - XXII									
	P44RR - XXIV									
Suelo	P6BS - III									
	P14BS - VII									
	P26BS - XIV									
	P30BS - XVII									
	P38BS - XIX									
	P38BS - XX									
Control	<i>E. coli</i>									

---

## Capítulo 6 - Estudios de interacción planta-microorganismo

---

## 6.1 Introducción

Para poder conocer el verdadero potencial que el uso de un microorganismo pueda tener en asociación con una especie vegetal, es necesario entender lo más detalladamente posible la influencia de las distintas variables de ese complejo sistema, conformado por la bacteria y la planta, pero también por el sustrato, las distintas condiciones ambientales, la presencia de contaminantes y las prácticas de laboreo.

El primer paso de ese largo camino de conocimiento es comenzar por estudiar si median o no interacciones entre la o las bacterias candidatas y la especie vegetal, si esa interacción es estable a lo largo del tiempo y si a partir de esa interacción se logra el propósito para el cual se dispuso la asociación (Kuiper et al., 2004). Una vez observado un efecto positivo, se buscará indagar en los mecanismos moleculares involucrados específicamente en dicha asociación.

Disponiendo de una especie vegetal tolerante a glifosato y de un banco de cepas bacterianas degradadoras y tolerantes que cumplen con los requisitos inicialmente propuestos para un proceso de rizorremediación, se evaluaron las interacciones entre ambos elementos.

Por un lado, se dispuso a la bacteria y la especie vegetal en sistemas axénicos, en donde se pudiese evaluar la influencia que tienen aquellos microorganismos que resultaron expresar *in vitro* diferentes capacidades de promoción de crecimiento vegetal, sobre *L. corniculatus*, en un ambiente controlado.

Por otro lado, a partir de herramientas moleculares como la marcación fluorescente, producto de la expresión de distintas proteínas fluorescentes por parte de las cepas de interés, se buscó observar la colonización y distribución espacial de estas cepas en la raíz, herramienta sumamente importante en la ecología microbiana (Errampalli et al., 1999; Ramos et al., 2013). Además, patrón de colonización y disposición espacial de los microorganismos en la superficie radicular se complementaron con imágenes microscopía electrónica de barrido electrónico.

Por último, para tener una aproximación acerca del funcionamiento del sistema de rizorremediación, se llevó a cabo un experimento de microcosmos, generando un sistema controlado de laboratorio que simula las condiciones a campo. A partir de los resultados obtenidos en sistemas de microcosmos, se pueden identificar factores críticos y obtener conclusiones extrapolables para un posible escalado a campo (Ruberto et al., 2013).

Durante esta etapa de trabajo se cumplieron los siguientes objetivos específicos:

6. Evaluación de la capacidad de las cepas degradadoras aisladas para colonizar la raíz de las especies vegetales candidatas.

8. Evaluación de la eficiencia de biodegradación de diferentes sistemas rizorremediación propuestos mediante ensayos de microcosmos.

## 6.2 Materiales y Métodos

### 6.2.1 Ensayos de inoculación en placas verticales

Se realizaron estudios *in vitro* de interacción planta-microorganismo con el objetivo de observar posibles efectos promotores del crecimiento vegetal de las cepas seleccionadas y previamente caracterizadas en el capítulo 5 sobre *Lotus corniculatus*. Dicha interacción se evaluó mediante ensayos de inoculación y posterior crecimiento en placas verticales (Vertical Agar Plates o VAPs, por sus siglas en inglés). El protocolo de base fue diseñado originalmente para *Arabidopsis thaliana* (Remans et al., 2006) y adaptado por primera vez al cultivar de *L. corniculatus* obtenido de la empresa Vreeken's Zaden, en los Países Bajos.

La técnica consistió en exponer plántulas recientemente germinadas (con raíces de aproximadamente 1 cm) a la cepa de interés, para luego observar la evolución del crecimiento de la plántula respecto a una plántula control (no inoculada), comparando distintos parámetros biométricos.

Para ello, se solidifica medio basal agarizado Gamborg B5 (Gamborg et al., 1968) (S6.1.1) en placas cuadradas de 120 mm de lado y luego se retira una franja de agar de aproximadamente 10 mm de ancho en uno de los bordes. Se siembra sobre el agar la cepa bacteriana de interés en una concentración aproximada de  $1.10^5$  UFC mL<sup>-1</sup>, y se apoya la plántula previamente esterilizada superficialmente (de acuerdo con el protocolo desarrollado en la sección 3.2.2) en el espacio donde se retiró la tira de agar, procurando colocar a la raíz en íntimo contacto con el agar inoculado. Seguidamente se coloca la placa en posición vertical y se lleva a cámara de cultivo vegetal (12 horas de fotoperíodo, 65% de humedad relativa, temperaturas de día/noche de 22°C/18°C y un PAR de 170  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), donde se evalúa visualmente el crecimiento durante 10 días, tiempo aproximado en el cual la raíz principal de las plántulas control hace contacto con la base de la placa. Se realizaron 5 replicados de placa por cepa, conteniendo 5 plántulas cada una, lo que hacen total de 25 plántulas por condición. Al décimo día, se tomaron imágenes de cada placa y se midió el largo total de raíz, largo de raíz principal, largo y recuento de raíces laterales mediante el software de análisis de imagen RootNav V 1.8.1 (Pound et al., 2013). Luego, se cosecharon las plántulas para determinar el peso fresco total y de raíz de cada una.

Basados en los resultados obtenidos en el capítulo 5 se seleccionaron y analizaron, a lo largo de tres experimentos independientes, las siguientes 8 cepas: *Ochrobactrum* P6BS - III, *Rhizobium* P8RR -

IV, *Rhizobium* P4RR - V, *Rhizobium* P14BS - VII, *Rhizobium* P16RR - IX, *Phyllobacterium* P30BS - XVII, *Ochrobactrum* P38BS - XX y *Rhizobium* P44RR - XXIV.

## 6.2.2 Estudios de microscopía

### 6.2.2.1 Conjugación de cepas bacterianas

Con el objetivo de poder visualizar mediante microscopía confocal laser la localización de las cepas microbianas en raíz de *Lotus*, se transfirieron a *Ochrobactrum* sp. P6BS-III y *Rhizobium* sp. P44RR-XXIV mediante conjugación, los plásmidos pMP4655 o pMP7604 portadores el gen de la proteína verde fluorescente (GFP) y el gen de resistencia al antibiótico tetraciclina (Bloemberg et al., 2000), o bien el gen de la proteína roja fluorescente (RFP) y el gen de resistencia a tetraciclina, respectivamente (Lagendijk et al., 2010). Estos procedimientos involucran la participación de tres cepas, la cepa donante, *E. coli* dH5a, portando el plásmido pMP4655 con el gen que codifica para proteína verde fluorescente (egfp) o el plásmido pMP7604 con el gen que codifica para proteína roja fluorescente (erfp), la cepa auxiliar, *E. coli* dH5a, portando el plásmido pRK2013 y las cepas receptoras, en este caso P6BS-III o P44RR-XXIV de acuerdo con la conjugación ensayada.

Los protocolos de conjugación consistieron en cultivar, en conjunto con las cepas P6BS-III y P44RR-XXIV la cepa donante (D) y auxiliar (H), en medio 869 durante un día. Al día siguiente, se transfirieron 100  $\mu$ L del cultivo de la cepa D a medio fresco 869 con tetraciclina (20 o 15  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> según correspondiese), y 100  $\mu$ L del resto de las cepas a medio fresco 869. Las cepas D y H se cultivaron a 37°C hasta alcanzar una D.O.<sub>600</sub> de 0,300-0,400, mientras que las cepas de P6BS-III y P44RR-XXIV lo hicieron a 30°C hasta alcanzar una D.O.<sub>600</sub> de aproximadamente 0,700. Se centrifugaron todas las cepas a 3.000 rpm por 10 minutos, luego se descargó el sobrenadante y los pellets se suspendieron en medio 869 fresco nuevamente. Paralelamente, en una placa de Petri con medio 869 sólido se depositó en una de sus mitades, un filtro estéril de acetato de celulosa Isopore (Millipore, Billerica, EE.UU.), y la otra mitad se dividió en tres partes equivalentes, en donde se indicó con un rotulador, la posición de la cepa receptora (P P6BS-III o P44RR-XXIV), la cepa D y la cepa H. Para cada conjugación se dispuso una de estas placas. Luego se pipetearon 50  $\mu$ L de cada una de las cepas, colocando una gota en el tercio correspondiente y luego el resto en el filtro de acetato de celulosa. Se incubaron las distintas placas a 30°C durante toda la noche. Transcurrido el tiempo de incubación, se tomó el filtro de celulosa y se depositó en un tubo estéril conteniendo MgSO<sub>4</sub> 10 mM, agitándose para liberar las

células del filtro. Una vez obtenida la suspensión, se plaquearon 100  $\mu\text{L}$  y de la suspensión y una dilución 1/10 de ésta en placas con medio selectivo, conteniendo tetraciclina (20 o 15  $\mu\text{g mL}^{-1}$  según correspondiese) y glifosato (500  $\text{mg Kg}^{-1}$ ) incubándose por 3 días a 30°C. Una vez observado el desarrollo de colonias, se tomaron 5 de cada placa y se sembraron por agotamiento en medio selectivo, para luego realizar a cada uno de estos aislamientos los controles de conjugación.

Crecidas las colonias, se corroboró el éxito de la transconjugación de acuerdo con el siguiente orden de experimentos:

1. Observación de presencia de fluorescencia bajo microscopio de fluorescencia. (Excitación de 480/40 nm con emisión de 510 nm para GFP y excitación 542/27 con emisión de 610 nm para RFP).
2. BOX-PCR para comparar patrones de banda entre las cepas participantes, de acuerdo con el protocolo realizado por Weyens y colaboradores (2009).
3. Secuenciación del gen del ARN ribosomal 16S de la cepa fluorescente.
4. Se verificó la estabilidad de las cepas haciendo varios subcultivos y repitiendo la observación en microscopio de fluorescencia.

#### 6.2.2.2 Estudios de microscopia confocal laser

Se realizaron cultivos de *L. corniculatus* en placas verticales, de acuerdo con el procedimiento indicado en la sección 6.2.1 pero en este caso, las semillas fueron esterilizadas, y luego inoculadas con las cepas transconjugantes obtenidas en la sección 6.2.2.1. Además, por contar con cepas que expresan GFP y RFP, se ensayó también la co-inoculación con *Ochrobactrum sp* P6BS-III y *Rhizobium sp* P44RR-XXIV. Luego de una semana de crecimiento en cámara de cultivo vegetal, las placas conteniendo las plántulas inoculadas con las distintas cepas fueron retiradas de las placas cuadradas y lavadas exhaustivamente con solución PBS estéril, para luego ser colocadas nuevamente en placas con medio fresco. De esta manera fueron transportadas a la instalación principal de imágenes microscópicas biomédicas de la Universidad de Amberes, Bélgica. Allí, las raíces se lavaron nuevamente con solución estéril de PBS y luego se colocaron en portaobjetos para obtener las imágenes en un equipo Ultra VIEW VoX (Perkin Elmer, Zaventem, Bélgica) bajo la operación y supervisión de la Dra. Isabel Pintelon.



Se usó una longitud de onda de excitación de 561 nm para la cepa marcada con RFP, 475 nm para la cepa marcada con GFP y 405 (Dapi) para el contraste de pared celular y estructura vegetal. Las lentes utilizadas para la adquisición de imágenes incluyeron un lente 40X CFI Plan Fluor (apertura numérica de 0,75; distancia de trabajo de 0,72 mm) y un lente 20X CFI Plan Apochromat VC (apertura numérica de 0,75 y distancia de trabajo de 0,72 mm). Las imágenes fueron tomadas usando una cámara Hamamatsu C9100-50 (Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu, Japón). Las imágenes se analizaron con el software ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/index.html>)







### 6.2.2.3 Estudios de microscopia electrónica de barrido (SEM)

Para obtener las imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM), las muestras de raíces inoculadas obtenidas de la misma forma que en la sección 6.2.2.2 se fijaron usando glutaraldehído al 4% durante la noche. Al siguiente día se deshidrataron mediante un gradiente creciente de etanol, que consistió en colocar la raíz soluciones de 30%, 50%, 70%, 95% y 100% cada 15 minutos. Por último, las muestras se congelaron a -20 °C en terbutil etanol, para luego sublimarse. Los preparados se enviaron al Instituto de Investigación de Materiales (IMO-IMOMEC) de la Universidad de Hasselt, Bélgica, en donde se tomaron las imágenes en un equipo Quanta 200 FEG-SEM (FEI Company, Eindhoven, Países Bajos).

### 6.2.3 Ensayo de microcosmos

Se llevó a cabo un ensayo de microcosmos el cual buscó evaluar la estabilidad de las cepas candidatas en raíz de *L. corniculatus* y en suelos sin cobertura vegetal a lo largo del tiempo, así como también buscó conocer la posible atenuación de glifosato causado por la presencia de las cepas *Ochrobactrum* sp P6BS-III y *Rhizobium* sp P44RR-XXIV. En la tabla 6.1 se presenta el diseño del ensayo.

**Tabla 6.1.** Combinación de variables del ensayo de microcosmos

	Sustrato	
	Suelo	Suelo + <i>Lotus corniculatus</i>
Sin inóculo		
<i>Ochrobactrum</i> sp. P6BS-III		
<i>Rhizobium</i> sp. P44RR-XXIV		

El suelo utilizado en el ensayo provino de muestras compuestas conservadas del Lote L4 (control del tratamiento L3, ver sección 4.1), el cual se tamizó y homogeneizó nuevamente mediante cuarteo, y luego se determinó la humedad. Fueron cargados 200 gramos de suelo en frascos de vidrio de 360 mL de capacidad, se cubrieron con tapa y se procedió a realizar un primer ciclo de autoclave, de 40 minutos de duración a 1 atm de sobrepresión. Los frascos se dejaron reposar por 2 días, para luego incrementar el porcentaje de humedad en un 5% mediante el agregado de agua destilada estéril y luego realizar un segundo ciclo de autoclave de 40 minutos de duración a 1 atm de sobrepresión. Se repitió el procedimiento anterior luego de 4 días, llevando finalmente todos los frascos a un porcentaje de humedad de aproximadamente 38% y tres ciclos de autoclave completos.

Las plántulas de *L. corniculatus* se obtuvieron a partir de germinar semillas y esterilizarlas superficialmente de acuerdo con el protocolo desarrollado en la sección 3.2.2. Luego de la esterilización superficial, las semillas fueron germinadas en medio Murashige-Skoog (S3.1.1) para control de esterilidad. Luego de una semana, las plántulas con raíces de aproximadamente 1 cm de longitud fueron seleccionadas para ser parte del ensayo.

Las cepas de *Ochrobactrum* sp P6BS-III y *Rhizobium* sp P44RR-XXIV fueron cultivadas en MSB-Gly (S4.1.1) a 200 rpm de agitación y  $25 \pm 1$  °C de temperatura hasta alcanzar la fase exponencial tardía. Luego se realizó una centrifugación a 3.000 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante, y el pellet celular se llevó a una  $DO_{600}$  de aproximadamente 1,000, correspondiente a una concentración de aproximadamente  $1.10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>.

Paralelamente, se preparó y esterilizó por autoclave la solución de inoculación de acuerdo con el protocolo sugerido por Sridhar (2004) (S6.1.2), sobre la cual se hicieron las suspensiones celulares finales, de un número aproximado de  $1.10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> para inocular las plántulas.

Los suelos también fueron inoculados con esta suspensión celular de modo de alcanzar una concentración final inicial aproximada de  $1.10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> de suelo. Las unidades experimentales que no contenían cepas fueron también aplicadas con solución de inoculación estéril con el mismo volumen que aquellas unidades experimentales con presencia de bacterias.

Las plántulas se sembraron en el suelo y después de 30 días, habiendo alcanzado un estadio de 7 hojas verdaderas se aplicó glifosato comercial (Roundup Ultramax®, Monsanto 74,7% de la sal de amonio) para alcanzar una concentración final en suelos de todas las unidades experimentales de 5 mg Kg<sup>-1</sup>.

Se tomaron muestras para cada condición en tres momentos diferentes: después de la aplicación de glifosato, el día 6 y el día 20. Para cada toma de muestra, se prosiguió de la siguiente manera:

En las unidades experimentales sin plantas, se separó una alícuota de suelo de aproximadamente 1,00 gramo para realizar un recuento de microorganismos heterótrofos totales de acuerdo al procedimiento indicado en la sección 4.2.3, tres alícuotas de aproximadamente 1,00 gramo que fueron colocadas en criotubos para posteriormente, hacer el seguimiento de la cepa en suelo utilizando la metodología de ARISA de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 4.2.6, y una alícuota de suelo de aproximadamente 5,00 gramos, que fue destinada al laboratorio del Centro de Investigaciones del Medio Ambiente de la Universidad de La Plata, Argentina y analizadas por el Dr. Damián Marino, quien realizó las determinaciones glifosato residual. En las unidades experimentales de suelo, cada frasco fue muestreado en los distintos tiempos.

En las unidades experimentales con plantas, las raíces fueron extraídas y junto con las partículas de suelo adheridas se colocaron en tubos de 50 mL cargados con 40 mL de solución de extracción NaCl 0,9% Tween 80 0,01%, previa remoción de las partes aéreas de la planta. Una vez cerrado el tubo, se colocó en agitación orbital a 200 rpm por 30 minutos. La suspensión se centrifugó a 10.000 rpm y  $4 \pm 1$  °C, descartándose el sobrenadante y conservándose el pellet, que fue transferido a un criotubo y reservado, para luego realizar el seguimiento de la cepa en raíz utilizando la metodología de ARISA. Se tomaron así mismo alícuotas de aproximadamente 1,00 g de suelo cercano a la raíz para realizar un recuento de microorganismos heterótrofos totales y otra alícuota de suelo de aproximadamente 5,00 gramos para determinar glifosato.

## 6.3 Resultados

### 6.3.1 Ensayos de inoculación en placas verticales

Los resultados de todos los parámetros biométricos medidos durante el ensayo de inoculación en placas verticales se muestran en la tabla 6.2. Como los ensayos fueron realizados fueron realizados por tanda, cada cepa evaluada se corresponde con su control de ensayo.

**Tabla 6.2.** Ensayos de inoculación en VAPs.

Cepa	Biomasa		Longitud de raíz			
	Total (mg)	Raíz (mg)	Total (mm)	Primaria (mm)	Promedio de raíces laterales (mm)	Número de raíces laterales
<b>Control*</b>	42,5 ± 5,8	18,5 ± 3,8	177,1 ± 39,0	100,4 ± 14,5	21,1 ± 9,5	3,9 ± 1,7
<b>Control**</b>	39,5 ± 6,9	16,9 ± 3,8	170,4 ± 46,1	108,5 ± 31,6	19,0 ± 12,8	3,0 ± 1,8
<b>Control***</b>	41,3 ± 6,5	17,0 ± 3,7	179,7 ± 61,4	112,6 ± 23,4	12,2 ± 6,5	5,1 ± 2,1
<b>P6BS-III</b>	39,9 ± 6,6	18,8 ± 4,6	162,0 ± 39,5	111,5 ± 25,1	14,9 ± 10,2	3,5 ± 1,4
<b>P8RR-IV</b>	36,7 ± 6,1	15,9 ± 3,6	161,2 ± 42,1	113,0 ± 28,0	18,0 ± 12,7	2,9 ± 1,4
<b>P4RR-V</b>	43,4 ± 9,8	18,6 ± 6,4	167,9 ± 45,6	108,4 ± 16,1	11,1 ± 5,3	4,8 ± 2,6
<b>P14BS-VII</b>	39,1 ± 6,3	17,5 ± 3,2	192,1 ± 44,2	109,4 ± 23,7	28,3 ± 15,0	3,1 ± 1,5
<b>P16RR-IX</b>	35,2 ± 5,9	16,8 ± 3,8	182,3 ± 46,8	112,6 ± 36,5	20,9 ± 12,2	3,3 ± 1,9
<b>P30BS-XXVII</b>	43,2 ± 6,8	19,0 ± 5,2	175,7 ± 53,9	105,4 ± 21,3	17,1 ± 9,3	3,6 ± 1,8
<b>P38BS-XX</b>	39,1 ± 7,9	17,2 ± 4,5	176,0 ± 39,3	115,1 ± 31,0	17,3 ± 10,7	3,8 ± 2,0
<b>P44RR-XXIV</b>	39,4 ± 8,0	19,8 ± 6,5	169,7 ± 71,7	105,5 ± 21,9	18,7 ± 12,8	3,1 ± 1,1

\* Corresponde al control de ensayo de las cepas P6BS-III y P44RR-XXIV

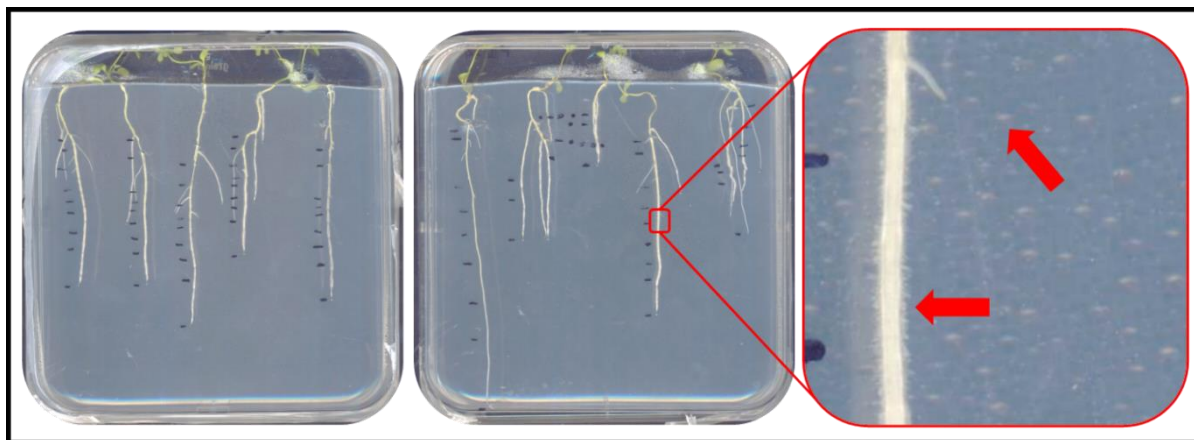
\*\* Corresponde al control de ensayo de las cepas P8RR-IV, P14BS-VII, P16RR-IX y P38BS-XX

\*\*\* Corresponde al control de ensayo de las cepas P4RR-V y P30BS-XXVII

De las cepas ensayadas, ninguna mostró diferencias significativas respecto a su control. Estos resultados pueden deberse a las diferencias en la velocidad de desarrollo radicular existentes entre de *A. thaliana* y *L. corniculatus* ya que, si bien el crecimiento de las plantas de Lotus fue exitoso, el tamaño, velocidad y desarrollo de esta especie vegetal pueden haber enmascarado el efecto positivo provocado por los microorganismos. Es así como, plántulas sin inocular de *Arabidopsis* alcanzan el fondo de la placa luego de dos semanas y con una gran cantidad de raíces laterales y por ende, una gran superficie radicular. En cambio, Lotus alcanza con su raíz principal el fondo de la placa al cabo entre los 7-10 días, sin producir muchas veces raíces secundarias en el control.

Sin embargo, a pesar de lo anteriormente mencionado, se observó un gran crecimiento en placa, tanto para *Ochrobactrum* P6BS - III y *Rhizobium* P44RR – XXIV, sin causar efecto negativo alguno en la

especie vegetal y manifestándose la presencia de vellosidades en algunas raíces, como se indica en la figura 6.1 (aunque las observaciones no son estadísticamente significativas).

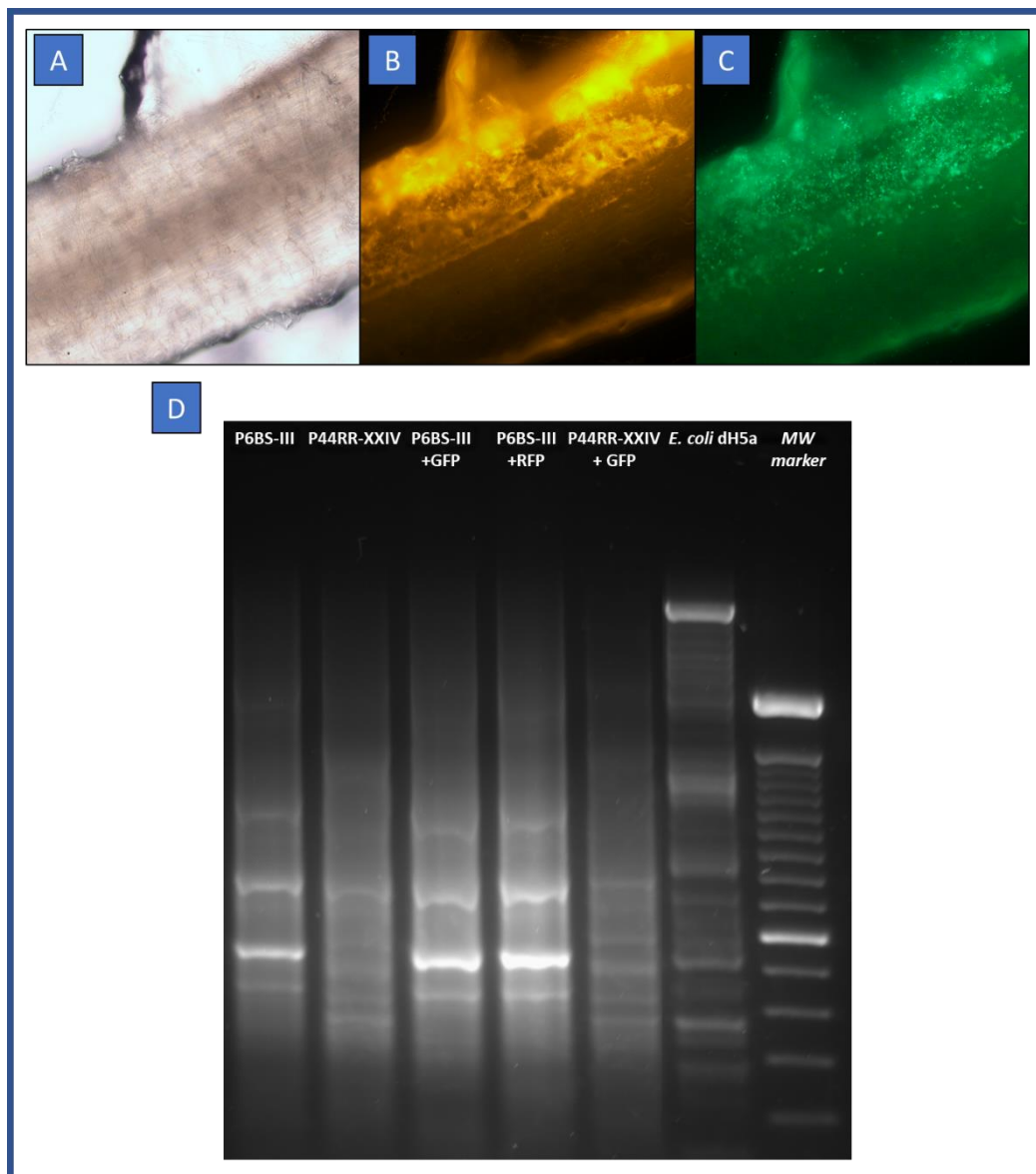


**Figura 6.1.** Ensayos de inoculación en VAPs. En el costado izquierdo se muestra una placa con plántulas no inoculadas (control). En la figura del centro, una placa con plantas inoculadas con *Ochrobactrum* sp. P6BS-III, y en la figura de la derecha se hace una ampliación de una de las raíces de la placa del centro, en donde se señala con flechas rojas, por un lado, las vellosidades radiculares y por el otro, el gran crecimiento microbiano en placa, manifestándose en colonias blanquecinas homogéneamente distribuidas.

### 6.3.2 Estudios de microscopía

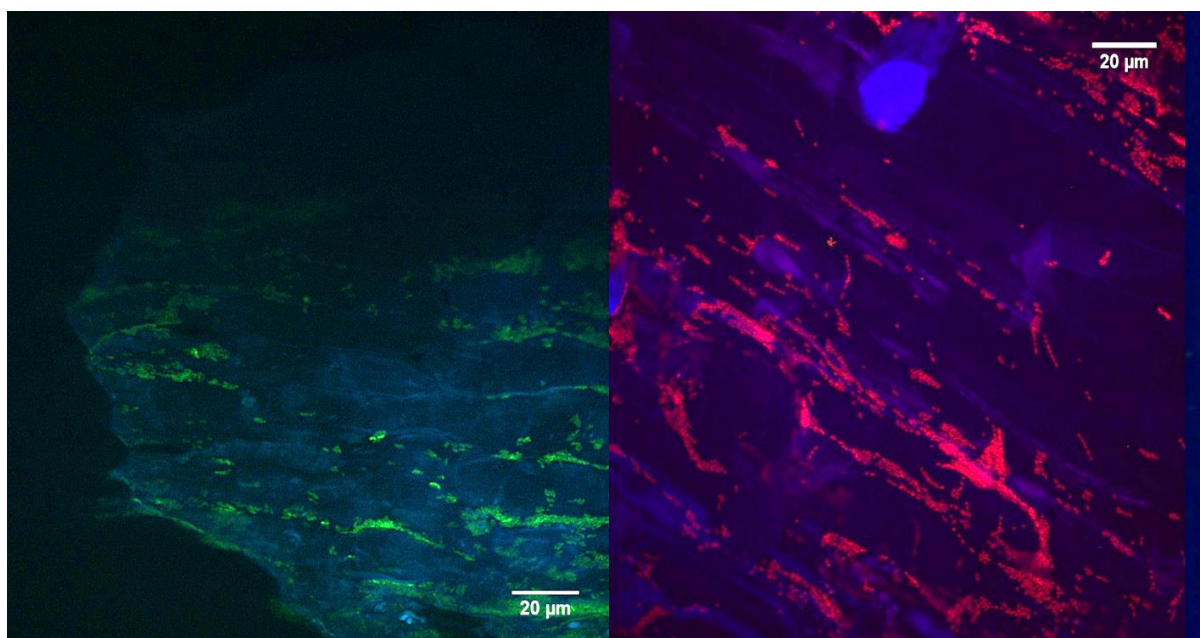
A partir del proceso de conjugación, se lograron obtener tres microorganismos transconjugantes: *Ochrobactrum* sp. P6BS-III GFP+, *Ochrobactrum* sp. P6BS-III RFP+ y *Rhizobium* sp. P44RR-XXIV GFP+. Estas tres cepas cumplieron con todos los pasos de control. En la figura 6.2 se muestra fluorescencia positiva de *Rhizobium* sp. P44RR-XXIV GFP+ y *Ochrobactrum* sp. P6BS-III RFP+, que fueron co-inoculadas en *L. corniculatus* a modo ilustrativo, aunque en un primer momento también fueron revisadas las cepas individualmente en placa. Se muestra también el patrón de bandas generado luego de la PCR BOX por cada cepa participante en la conjugación. Este patrón de bandas es característico de cada cepa y por lo tanto es muy útil a la hora de distinguir a la bacteria receptora de la donante, auxiliar, o alguna contaminación. Se esperaba que el patrón de bandas de las cepas receptoras *wild-type* fuera similar al de las cepas transconjugantes. Esto ocurrió en tres de los cuatro casos. Siendo estos dos ensayos positivos, se volvieron a cultivar las cepas transconjugantes a partir de las mismas colonias de las que se tomaron inicialmente muestras. Una vez alcanzado el máximo de DO, cada una de las cepas se almacenó en el freezer a -40 ° C en MgSO<sub>4</sub> 10 mM y 20% de glicerol y, paralelamente,

se realizó una segunda extracción de ADN, para secuenciar y confirmar identidad a partir del gen del ADN ribosomal 16S.



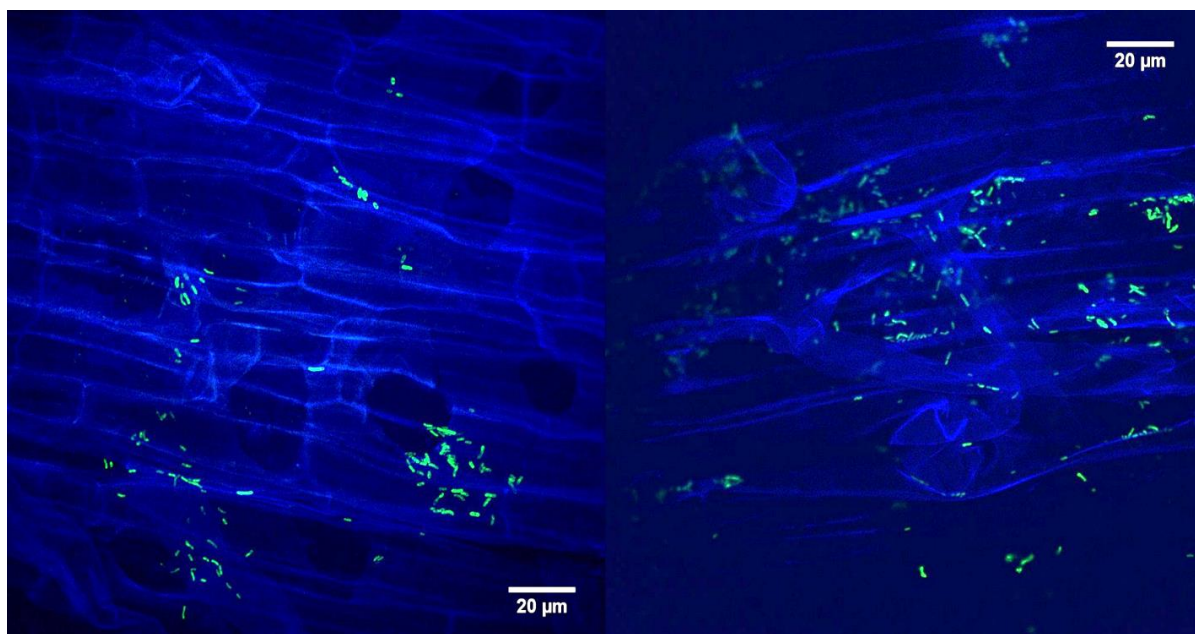
**Figura 6.2.** A. Imagen microscópica de una sección de raíz de *L. corniculatus* co-inoculada con de *Rhizobium sp.* P44RR-XXIV GFP+ y *Ochrobactrum sp.* P6BS-III RFP+ sin excitación. B. Mismo campo, con luz de excitación 542/27, donde pueden verse las células de *Ochrobactrum sp.* P6BS-III RFP+ adheridas a la raíz. C. Mismo campo, con luz de excitación 480/40, donde pueden verse las células de *Rhizobium sp.* P44RR-XXIV GFP+ adheridas a la raíz. D. PCR-BOX mostrando los distintos patrones de banda producidos por las cepas *wild-type* y transconjugantes.

Las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal laser muestran que ambas cepas bacterianas permanecen unidas a raíz luego de los sucesivos lavados. En todas las imágenes analizadas de la raíz de *L. corniculatus*, las cepas de bacterias conservan una distribución definida en la superficie de raíz. P6BS-III aparece asociado en acúmulos de pequeños grupos y sobre los bordes de la pared celular de la raíz, mientras que P44RR-XXIV parece estar distribuido de manera homogénea y podría estar más asociada a las vellosidades radiculares, principalmente como células individuales y en una densidad menor que P6BS-III. En las figuras 6.3, 6.4 y 6.5 se muestran las imágenes de *L. corniculatus* inoculado con P6BS-III, con P44RR-XXIV y co-inoculado con ambas cepas, respectivamente.

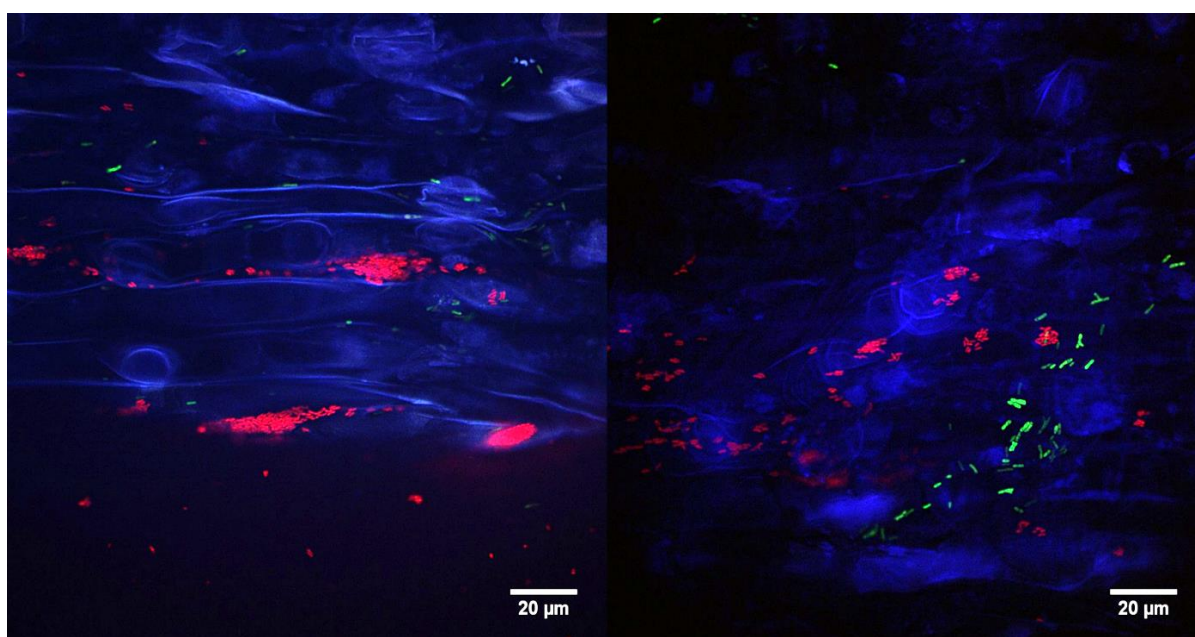


**Figura 6.3.** Imágenes de microscopía confocal laser de raíces de *L. corniculatus* inoculadas con *Ochrobactrum* sp. P6BS-III. En la figura de la izquierda, se puede observar la cofia de la raíz principal y *Ochrobactrum* sp. P6BS-III GFP+. En la figura de la derecha se observa otra imagen de raíz principal, pero esta vez en una zona intermedia, inoculada con *Ochrobactrum* sp. P6BS-III RFP+.





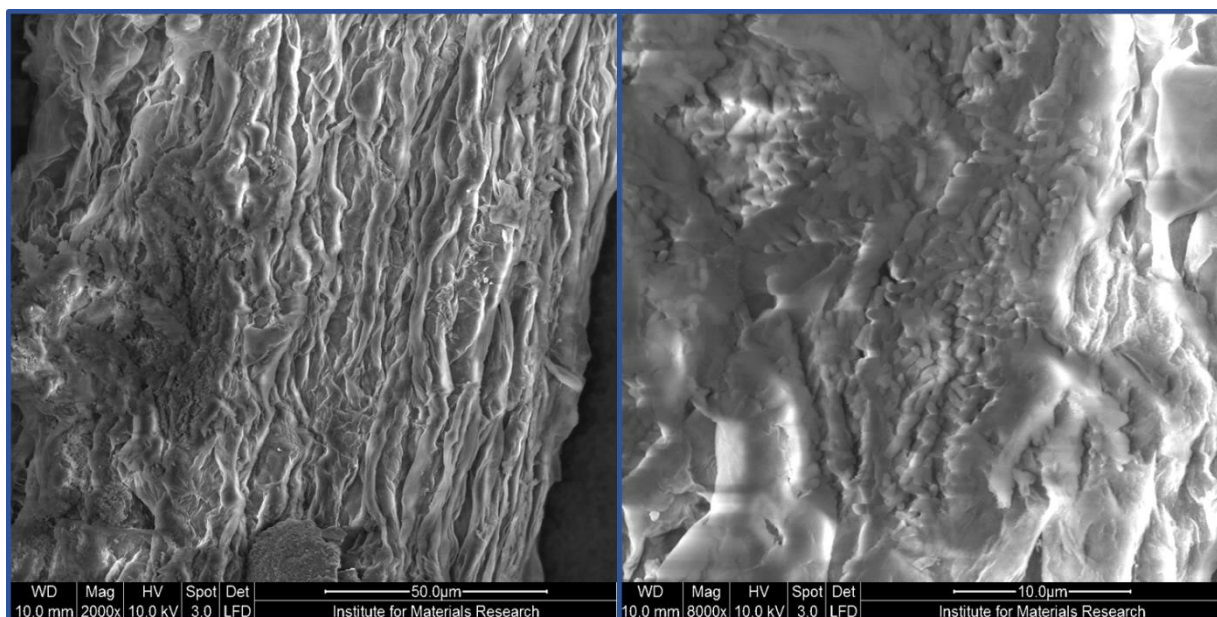
**Figura 6.4.** Imágenes de microscopía confocal laser de raíces de *L. corniculatus* inoculadas con *R. sp.* P44RR-XXIV GFP+. Se ve en la figura de la izquierda, que las bacterias están en un plano distinto al de la pared celular de la raíz, asociadas a las vellosidades. En la figura de la derecha, que corresponde a muestra, se ve que las bacterias se encuentran en baja densidad, y distribuidas de manera irregular.



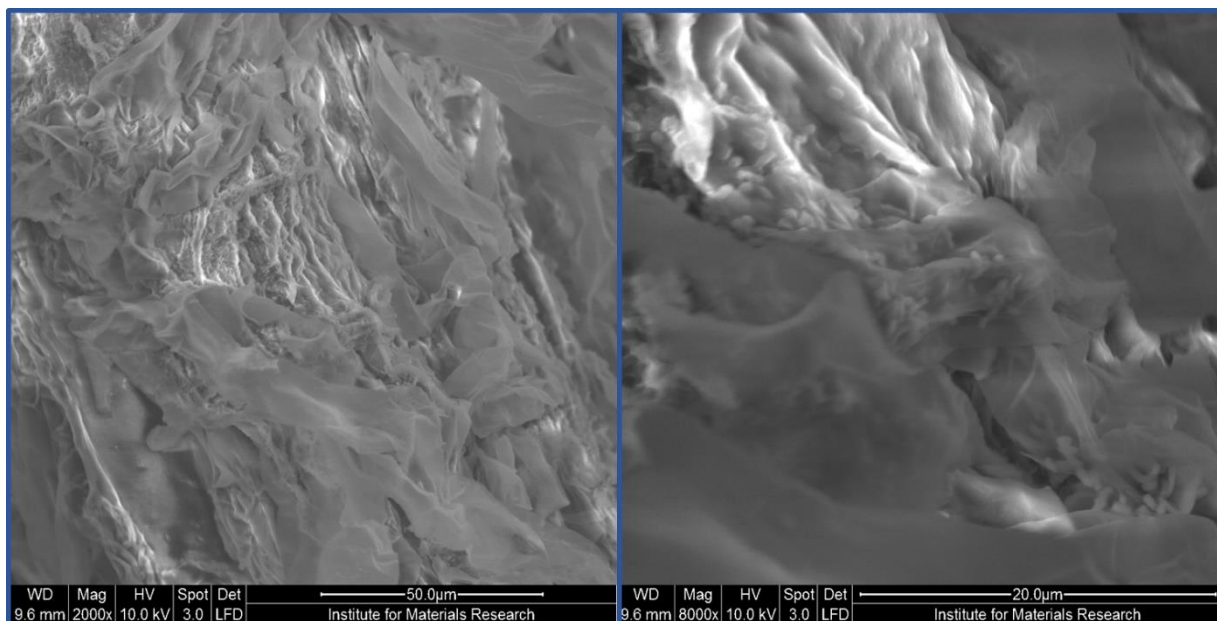
**Figura 6.5.** Imágenes de microscopía confocal laser de raíces de *L. corniculatus* co-inoculadas con *Rhizobium sp.* P44RR-XXIV GFP+ y *Ochrobactrum sp.* P6BS-III RFP+. En ambas figuras se aprecia las diferentes disposiciones que adquieren las células en la superficie radicular.



Los resultados obtenidos mediante microscopía electrónica de barrido mostraron la presencia de *Rhizobium* sp. P44RR-XXIV y *Ochrobactrum* sp. P6BS-III en raíces de *L. corniculatus* luego del proceso de fijación (Figura 6.6 y Figura 6.7), lo que podría ser indicativo de algún tipo de asociación.



**Figura 6.6.** Imágenes de microscopía electrónica de barrido de raíces de *L. corniculatus* inoculadas con *O.* sp. P6BS-III y posteriormente fijadas. La figura de la izquierda está magnificada 2000 veces, mientras que la de la derecha 8000 veces.



**Figura 6.7.** Imágenes de microscopía electrónica de barrido de raíces de *L. corniculatus* inoculadas con *R.* sp. P44RR-XXIV y posteriormente fijadas. La figura de la izquierda está magnificada 2000 veces, mientras que la de la derecha 8000 veces.

### 6.3.3 Ensayo de microcosmos

Como se mencionó en el punto 6.2.3, el ensayo de microcosmos estuvo orientado a dos objetivos, que fueron: i-evaluar la evolución de las distintas cepas inoculadas a lo largo del ensayo, y ii-comprobar la atenuación de glifosato en las distintas unidades experimentales (Figura 6.8).

En concordancia con los resultados previamente obtenidos en sistemas sencillos, se verificó que *L. corniculatus* toleró la aplicación de glifosato comercial sin mostrar signo alguno de afectación a lo largo de todo el desarrollo del ensayo.



**Figura 6.8.** Imágenes del ensayo de microcosmos. En el costado izquierdo de la figura, se observan unidades experimentales de suelo, mientras que en el costado derecho se ven las unidades experimentales con *L. corniculatus*

Como se sugieren generalmente para suelos con las características fisicoquímicas y texturales que estos poseen, antes de comenzar el ensayo se realizó un recuento de heterótrofos totales en las unidades experimentales sin inóculos, para evaluar éxito del proceso de esterilización (Trevors, 1996), obteniéndose valores que rondaron las  $1.10^8$  UFC  $g^{-1}$  suelo seco. Esto muestra claramente que los tres ciclos de autoclave, con sus respectivos incrementos de humedad, no fueron suficientes para llevar los suelos a un número de microorganismos no detectable. Esto no solo da cuenta de la resiliencia que presenta la microflora de estos suelos, sino de la complejidad en el manejo experimental de los sistemas de microcosmos.

Si bien no resulta imprescindible partir de suelos estériles, ya que el objetivo de los sistemas de microcosmos es acercar el ensayo a las condiciones reales de aplicaciones, la intención de disminuir la carga biótica del suelo fue minimizar la influencia de otros microorganismos que pudiesen participar

en la degradación de glifosato. Además, disminuir el número total de microorganismos viables podría favorecer la localización de la banda de la cepa en el perfil de ARISA de la muestra, ya que ambas cepas aisladas poseen bandas tenues, que no son visibles en el perfil de bandas de la muestra a partir de la que fueron aisladas (Figura S6.1.3). Así, si bien es claro que la metodología empleada no amplifica ADN de microorganismos viables, sino de ADN total bacteriano, la gran cantidad de biomasa agregada, sumada a la falta de competencia, pretendían facilitar el rastreo de las cepas por vía molecular.

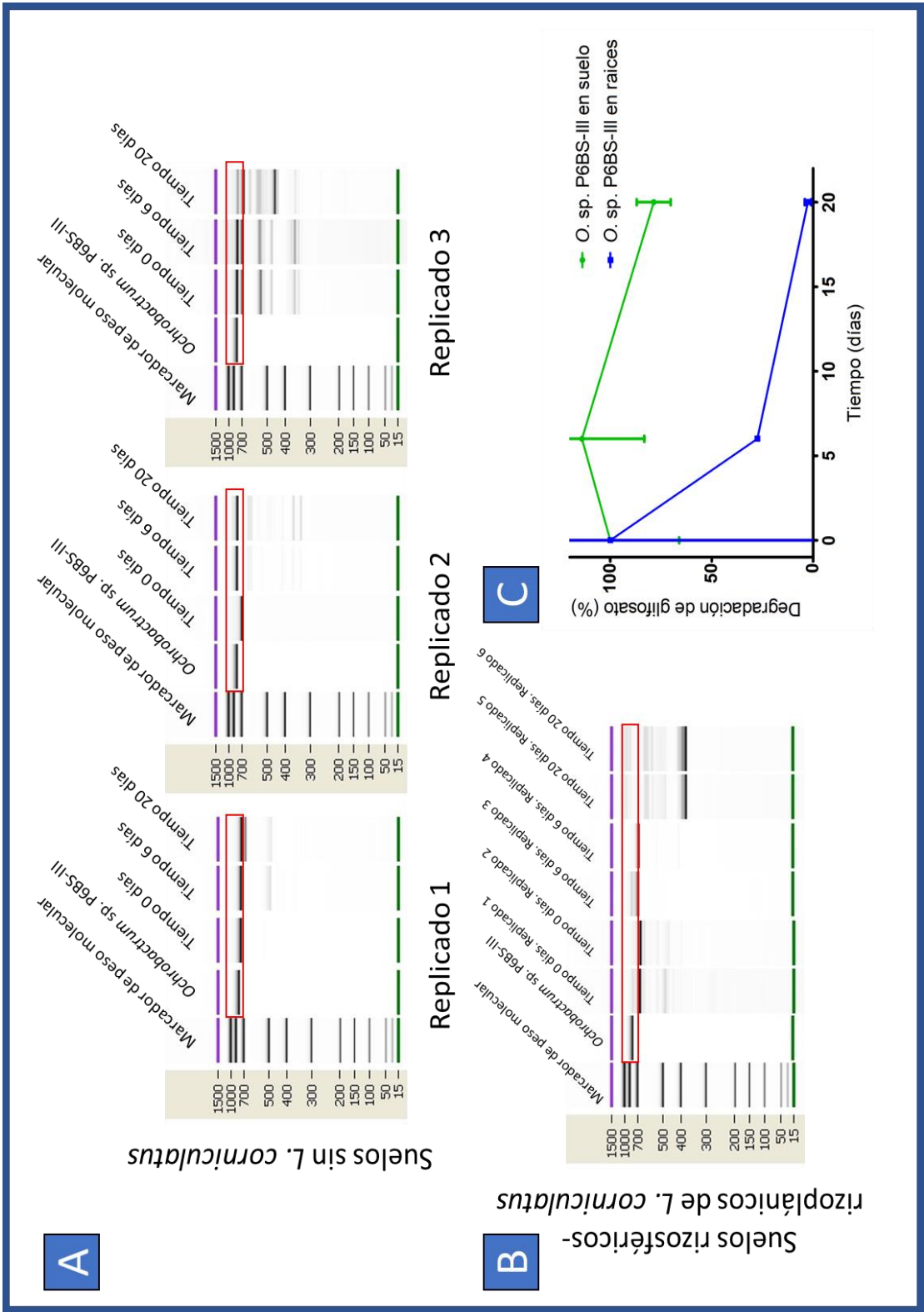
En la figura 6.9 se muestran los resultados obtenidos para las unidades experimentales sin inóculos, utilizadas como controles. Tanto en los perfiles de ARISA obtenidos a partir de las muestras de suelos, como las de muestras de rizosfera-rizoplana, se puede observar la evolución del perfil de bandas a lo largo del ensayo. En las muestras de suelo (Figura 6.9A), al corresponder a la misma unidad experimental medida sucesivamente a lo largo del tiempo, puede verse como este patrón de bandas es similar en los tiempos 6 y 20 para los dos replicados, posiblemente reflejo de que allí la comunidad, constituida por los sobrevivientes del proceso de esterilización, logró un cierto grado de estabilización.

Respecto a los valores de glifosato determinados en los controles (tanto con o sin *L. corniculatus* en la muestra), se observa que existe una gran dispersión de valores para todos los tiempos, fenómeno que se repite a lo largo de todas las determinaciones (Figura 6.9C). Es sabido que la determinación de glifosato en suelos es, en términos analíticos, sumamente dificultosa (Ibanez et al., 2005; Druart et al., 2011; Arkan, 2015). Ello se debe a su estructura química como también a las distintas interacciones que presenta con la matriz, como fue discutido pertinentemente en el capítulo 1. Variaciones en la adsorción en conjunto con cambios de humedad (por riego o por evaporación), pueden haber cambiado la eficiencia en la extracción en cada muestra. No existieron, considerando esta dispersión, diferencias significativas entre los valores a tiempo 0 y los valores a tiempo final. Sin embargo, y como se detalla a continuación, se observa en ambos microcosmos inoculados una tendencia a la degradación a tiempos finales de ensayo.

Los resultados de las muestras de microcosmos conteniendo *Ochrobactrum* sp. P6BS-III se muestran en la figura 6.10. En los perfiles de ARISA de suelos, se ven bandas de peso molecular similar a la de P6BS-III, aunque con pequeñas diferencias (Figura 6.10A). Existe ahora en este caso una tendencia de disminución de glifosato en función del tiempo, si bien los valores del tiempo 0 respecto a los otros tiempos no son estadísticamente significativos (Figura 6.10C). De igual manera ocurre con la concentración de glifosato en función del tiempo en los microcosmos que tienen raíces inoculadas con P6BS-III (Figura 6.10C). A su vez, puede observarse en al menos un perfil de tiempo la banda de peso molecular similar a la generada por P6BS-III (Figura 6.10B).

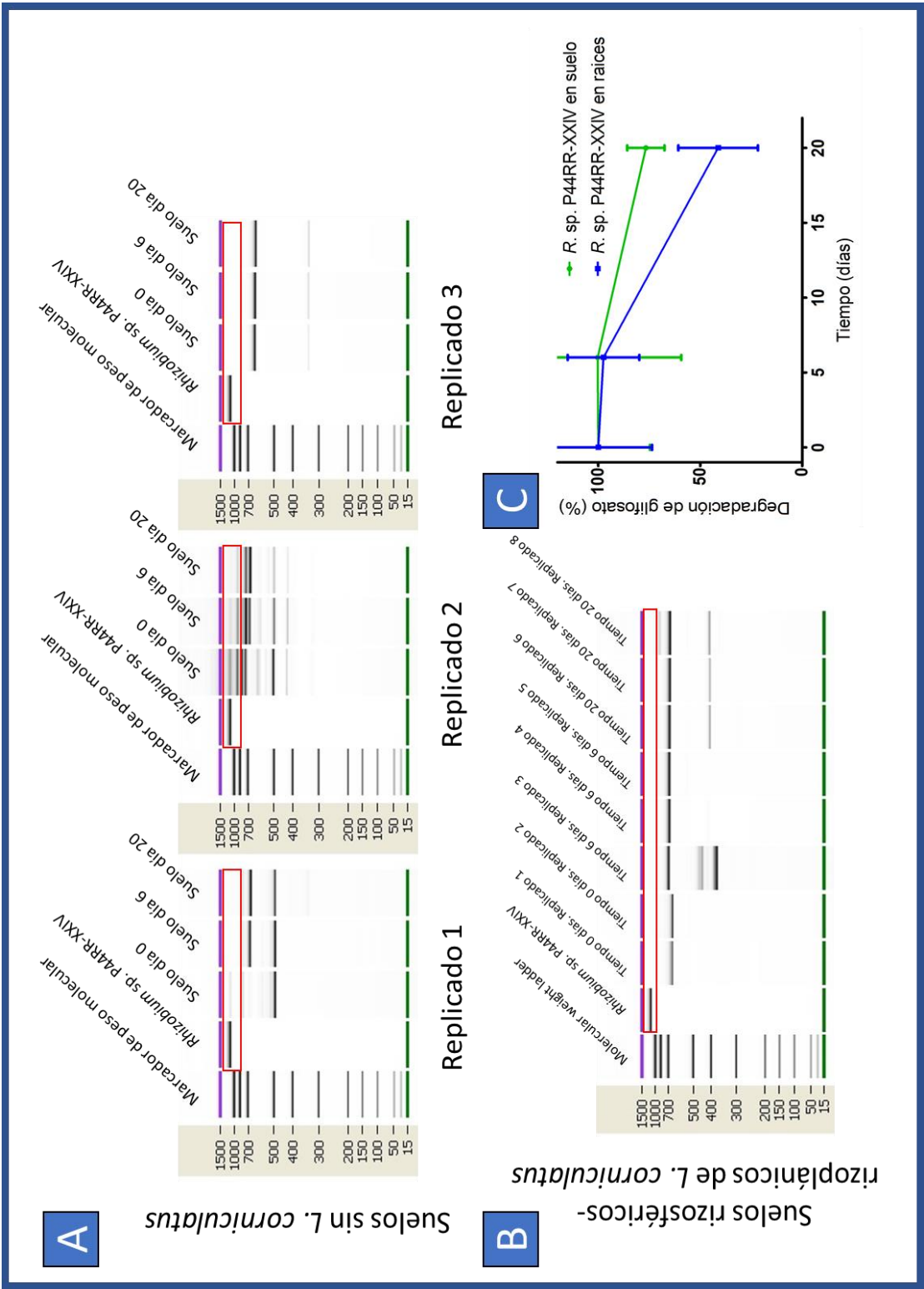
Los patrones ARISA en los microcosmos de suelos de *Rhizobium sp.* P44RR-XXIV revelaron la presencia de una banda con un peso molecular similar en dos de los tres replicados, disminuyendo su intensidad en función del tiempo (Figura 6.11A). Cuando los patrones ARISA se analizan en las muestras de rizosfera-rizoplana, no es posible ver una banda asociada con el peso molecular de P44RR-XXIV (Figura 6.11B). Si bien las diferencias entre las diferentes concentraciones de glifosato en función de los días no son significativas, es posible en este caso ver una tendencia decreciente también en suelos con raíz inoculados (Figura 6.11C).





**Figura 6.10.** A. Perfiles de ARISA de suelos inoculados con *Ochrobactrum* sp. P6BS-III. B. Perfiles de ARISA de suelos rizosféricos inoculados con la misma cepa. C. Cuantificación de glifosato en las unidades experimentales del microcosmos inoculadas con P6BS-III





**Figura 6.11.** A. Perfiles de ARISA de suelos inoculados con *Rhizobium* sp. P44RR-XXIV. B. Perfiles de ARISA de suelos rizosféricos inoculados con la misma cepa. C. Cuantificación de glifosato en las unidades experimentales del microcosmos inoculadas con P44RR-XXIV.

## 6.4 Conclusiones

A lo largo del presente capítulo, se evaluaron los aspectos centrales de la interacción planta-microorganismo entre cepas bacterianas degradadoras y la especie vegetal tolerante seleccionada.

Los primeros ensayos en VAPs, si bien no presentaron diferencias significativas para los parámetros biométricos analizados en las plántulas inoculadas respecto a las plántulas control, mostraron que las cepas estudiadas pudieron coexistir con la especie vegetal sin provocar ningún signo de daño en éstas. Esto permite pensar en que podrán explorarse distintas alternativas para vehicular el microorganismo asociado a la semilla previa implantación, lo que facilitaría mucho el uso de este tipo de tecnologías. La gran velocidad de crecimiento de la raíz principal y el poco desarrollo de la parte aérea en el tiempo propuesto, invitan a probar sistemas experimentales distintos que permitan realizar observaciones más prolongadas.

Por otro lado, las imágenes obtenidas a partir de microscopía permitieron ver cómo es la disposición de las cepas candidatas en raíz una vez inoculada las semillas en condiciones axénicas. *Ochrobactrum* sp. P6BS-III mostró patrones de asociación compatibles con una adhesión positiva en raíz, por la ubicación cerca de las uniones celulares y la aglomeración que presentan. A partir de estas observaciones, y contando con el genoma completamente secuenciado, se plantean nuevas hipótesis para explorar ahora en mayor profundidad capacidades relacionadas con adhesión, *quorum sensing* y formación de biofilms, entre otros.

En *Rhizobium* sp. P44RR-XXIV, no es claro el patrón observado en raíz, y si bien el proceso de infección para la formación de nódulos comienza en vellosidades, el genoma de P44RR-XXIV no presenta genes de simbiosis (ni tampoco se observó que formara nódulos en los distintos experimentos ensayados). No queda claro entonces aquí si la distribución de la cepa es azarosa (y producto del lavado en PBS) o si existe realmente una elección de habitar estas vellosidades y no otras partes de la arquitectura de la raíz. Por otro lado, imágenes de microscopía electrónica muestran a la cepa presente en raíz, lo que resulta significativo, ya que la astringencia química del proceso de lavado y fijación requiere que la cepa esté fuertemente adherida a la raíz.

A partir de estos estudios, surgen nuevos interrogantes para continuar con la exploración de las posibles asociaciones planta-bacteria entre estos sistemas biológicos en un futuro.



El ensayo de microcosmos develó que *L. corniculatus* inoculado con *Ochrobactrum sp.* P6BS-III muestra una atenuación casi completa de los 5 mg Kg<sup>-1</sup> de suelo iniciales al cabo de 20 días, tiempo más que alentador para el sistema remediador propuesto. Si bien el ensayo de microcosmos presentó dificultades experimentales propias de sistemas a campo, como las dificultades en la esterilización del suelo o durante la determinación analítica, la atenuación observada, junto con la presencia de bandas tenues en el perfil de ARISA, en contraste con la no degradación en las unidades experimentales control, podrían indicar que esta asociación podría resultar en un sistema exitoso de rizorremediación. Se pretende en un futuro, poder llevar a cabo ensayos mas exhaustivos para alcanzar resultados estadísticamente significativos. A la vez, si bien tampoco las diferencias no son significativas, el ensayo de degradación en suelo también muestra tendencia en la degradación. Estos resultados son más que alentadores para continuar en un futuro distintos experimentos que involucren esta asociación a mayor escala.

## 6.5 Referencias

- Arkan, T. (2015). The role of derivatization techniques in the analysis of glyphosate and aminomethylphosphonic acid by chromatography. *Microchem. J.* 121, 99–106. doi:10.1016/j.microc.2015.02.007.
- Bloemberg, G. V., Wijfjes, A. H. M., Lamers, G. E. M., Stuurman, N., and Lugtenberg, B. J. J. (2000). Simultaneous Imaging of *Pseudomonas fluorescens* WCS365 Populations Expressing Three Different Autofluorescent Proteins in the Rhizosphere: New Perspectives for Studying Microbial Communities. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13, 1170–1176. doi:10.1094/MPMI.2000.13.11.1170.
- Druart, C., Delhomme, O., de Vaufleury, A., Ntcho, E., and Millet, M. (2011). Optimization of extraction procedure and chromatographic separation of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in soil. *Anal. Bioanal. Chem.* 399, 1725–32. doi:10.1007/s00216-010-4468-z.
- Errampalli, D., Leung, K., Cassidy, M. B., Kostrzynska, M., Blears, M., and Lee, H. (1999). Applications of the green fluorescent protein as a molecular marker in environmental microorganisms. 35, 187–199.
- Gamborg, O. L., Miller, R. A., and Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50, 151–158. doi:10.1016/0014-4827(68)90403-5.
- Ibanez, M., Pozo, O., Sancho, J., Lopez, F., and Hernandez, F. (2005). Residue determination of glyphosate, glufosinate and aminomethylphosphonic acid in water and soil samples by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1081, 145–155. doi:10.1016/j.chroma.2005.05.041.
- Kuiper, I., Lagendijk, E. L., Bloemberg, G. V., and Lugtenberg, B. J. J. (2004). Rhizoremediation : A Beneficial Plant-Microbe Interaction Bioremediation : A natural method. *Society* 17, 6–15.
- Lagendijk, E. L., Validov, S., Lamers, G. E. M., De Weert, S., and Bloemberg, G. V. (2010). Genetic tools for tagging Gram-negative bacteria with mCherry for visualization in vitro and in natural habitats, biofilm and pathogenicity studies. *FEMS Microbiol. Lett.* 305, 81–90. doi:10.1111/j.1574-6968.2010.01916.x.
- Pound, M. P., French, A. P., Atkinson, J. A., Wells, D. M., Bennett, M. J., and Pridmore, T. (2013). RootNav: Navigating Images of Complex Root Architectures. *Plant Physiol.* 162, 1802–1814. doi:10.1104/pp.113.221531.

- Ramos, H. J. O., Yates, M. G., Pedrosa, F. O., and Souza, E. M. (2013). "Approaches for the Design of Genetically Engineered Bacteria for Ecological Studies and Biotechnological Applications," in *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere*, ed. F. J. de Bruijn (Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Ltd).
- Remans, T., Nacry, P., Pervent, M., Girin, T., Tillard, P., Lepetit, M., et al. (2006). A Central Role for the Nitrate Transporter NRT2.1 in the Integrated Morphological and Physiological Responses of the Root System to Nitrogen Limitation in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 140, 909–921. doi:10.1104/pp.105.075721.
- Ruberto, L., Patricio, W., and Cormack, M. (2013). Microcosms : A Key Tool for the Scaling Up of Soil Bio / Phytoremediation Processes.
- Sridhar, V., Brahmaprakash, G. P., and Hegde, S. V (2004). Development of a Liquid Inoculant Using Osmoprotectants for Phosphate Solubilizing Bacterium ( *Bacillus megaterium* )\*. 17, 251–257.
- Trevors, J. T. (1996). Sterilization and inhibition of microbial activity in soil. *J. Microbiol. Methods* 26, 53–59. doi:10.1016/0167-7012(96)00843-3.
- Weyens, N., Taghavi, S., Barac, T., van der Lelie, D., Boulet, J., Artois, T., et al. (2009). Bacteria associated with oak and ash on a TCE-contaminated site: Characterization of isolates with potential to avoid evapotranspiration of TCE. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 16, 830–843. doi:10.1007/s11356-009-0154-0.

## S6.1 Material suplementario

### S6.1.1 Medio Gamborg B5

Compuesto	Cantidad (mg L <sup>-1</sup> )
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025
FeNaEDTA	36,70
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3,00
KI	0,75
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	10,00
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2,00
CaCl <sub>2</sub>	113,23
KNO <sub>3</sub>	2500,00
MgSO <sub>4</sub>	121,56
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	130,44
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	134,00
Mioinositol	100,00
Ácido nicotínico	1,00
Piridoxina HCl	1,00
Tiamina HCl	10,00
Agar:	10 g

pH: 3.5-4.5

Referencia bibliográfica:

Gamborg, O. L., Miller, R. A., and Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50, 151–158. doi:10.1016/0014-4827(68)90403-5.

**S6.1.2 Medio de inoculación Líquido**

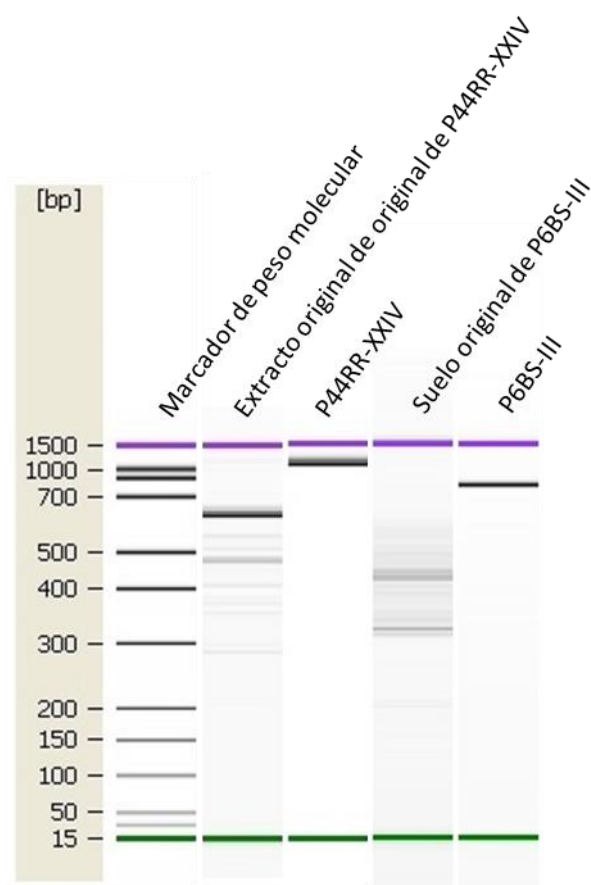
Compuesto	Cantidad (g L <sup>-1</sup> )
Peptona	5,0
Extracto de carne	3,0
Glucosa	5,0
NaCl	5,0
Polivinil pirrolidona (PVP)	20,0
CaCl <sub>2</sub>	0,14
FeCl <sub>3</sub>	8,4 mg
NH <sub>4</sub> Cl	0,6
NaOH	0,16
Glicerol	12 mL

pH: 6,8

Referencia bibliográfica:

Sridhar, V., Brahmaprakash, G. P., and Hegde, S. V (2004). Development of a Liquid Inoculant Using Osmoprotectants for Phosphate Solubilizing Bacterium (*Bacillus megaterium*). 17, 251–257.

**S6.1.3 Comparación de perfiles de ARISA de las cepas utilizadas en el ensayo de microcosmos y los perfiles de ARISA correspondientes a las muestras originales de las cuales fueron aisladas.**



**Figura S6.1.3.** Comparación de perfiles de ARISA de las cepas utilizadas en el ensayo de microcosmos y los perfiles de ARISA correspondientes a las muestras originales de las cuales

---

## **Capítulo 7 - Conclusiones generales y perspectivas a futuro**

---

## 7.1 Conclusiones generales y perspectivas a futuro

Actualmente, el glifosato representa uno de los mayores problemas ambientales en la República Argentina, especialmente en la región de la Pampa Húmeda. Esta región no solamente conforma la principal zona agro-productiva del país, sino que también concentra la mayor densidad de población. A su vez, la dependencia entre el modelo de producción agrícola y el paquete tecnológico del cual el glifosato forma parte, permiten inferir que el uso del herbicida no disminuirá en un futuro cercano y, de hacerlo, será por el reemplazo de alguna otra molécula que juegue un papel similar.

Tanto los fenómenos que involucran el uso del glifosato, entendidos desde una perspectiva histórica, económica y estructural del sector agropecuario, como el conocimiento de la tecnología de la cual forma parte, escapan a la población en general. Sin embargo, no son pocas las voces que se alzan en favor o en contra del uso de este paquete tecnológico. Aquellas visiones centradas en la agricultura orgánica y familiar proponen el cambio de paradigma de producción agrícola actual haciendo foco en el desarrollo de economías a pequeña escala, promoviendo fuertes transformaciones socioculturales. Los principales beneficios consisten en generar una mejora de las economías rurales, el cuidado de la biodiversidad, y una mínima generación de pasivos ambientales. Su práctica, sin embargo, desestima las consecuencias económicas, tanto a escala regional como global, ya que nuestro país depende fuertemente de la exportación de determinados cereales y oleaginosas. A su vez, no considera el alcance del impacto que esta transformación produce sobre actores que no están involucrados directamente en la unidad de producción agrícola. Por otro lado, aquellas voces centradas en el modelo productivo agrícola actual hacen foco en el modelo de economía globalizada que nos posiciona como un país a la vanguardia en el campo de la agrobiotecnología, con estructuras socioeconómicas bien definidas y organizadas, las que constituyen el motor de desarrollo económico actual. Sin embargo, desestiman las presiones que el mercado tiene sobre el consumo y la falta de regulación y educación respecto al uso de agroquímicos en general, provocando grandes pasivos ambientales, entre otras consecuencias discutidas en el capítulo 1 de esta tesis.

Frente a estas posturas, muchas veces sesgadas por distintos grupos formadores de opiniones, existe una realidad innegable, y que refiere a la contaminación de los cuerpos de agua presentes en la Pampa Húmeda con esta molécula, y cuya consecuencia es aún desconocida.

Como una estrategia para generar un primer paso que acerque estas dos posiciones y generar cambios graduales que resulten una mejora del agroecosistema mediante la reducción de pasivos



ambientales, este trabajo de tesis pretende generar el conocimiento necesario para diseñar una herramienta agrobiotecnológica para la rizarremediación de residuos de glifosato en suelos agrícolas, que funcione de manera completamente integrada al modo de explotación imperante en la región. Dicha integración es crítica para la adopción de esta tecnología, de modo que contribuya a disminuir el pasivo ambiental e impida que el glifosato residual en suelo termine en los cuerpos de agua, sin perturbar la explotación económica principal e incluso aumentando su rentabilidad en un marco más sustentable.

Como punto de partida para el desarrollo de este sistema de rizarremediación, se realizó la prospección de especies vegetales que toleren los máximos niveles de glifosato reportados en suelos de uso agronómico y que, a su vez, estén disponibles comercialmente. Esto significa que la incorporación de esta tecnología no solo lleva implícito el concepto de beneficio económico para el productor agropecuario, sino que asegura además la disponibilidad de germoplasma para que éste sea usado en las grandes extensiones que comprende la Pampa Húmeda. Bajo esta premisa, los resultados obtenidos en el capítulo 3 mostraron que el *Lotus corniculatus* cultivar “Gladiador” toleró una dosis de 5 mg Kg<sup>-1</sup> de glifosato comercial en condiciones de máxima biodisponibilidad sin mostrar cambios significativos, y superando el equivalente a las mayores concentraciones residuales determinadas en suelos agrícolas. A su vez, se profundizó la caracterización determinando que *L. corniculatus* también podría soportar el equivalente a una fuerte deriva de aplicación, entendiendo que su implantación permanente, en contraposición a los distintos ciclos del cultivo, haría muy probable el impacto por derivas de aplicación del agroquímico. *L. corniculatus* posee además los beneficios propios de las leguminosas, que incluyen microorganismos simbioses que fijan biológicamente nitrógeno, fertilizando el suelo; es adaptable a zonas de la topografía donde los cultivos principales no crecen y posee un buen desarrollo tecnológico debido a su extenso uso a lo largo del continente europeo, América y Asia.

El sitio donde se realizó la toma de muestra para la obtención de los microorganismos tolerantes y degradadores de glifosato presentó, desde un primer momento, características superadoras respecto a otros posibles sitios en donde pudiesen encontrarse especies de *Lotus* dentro de la Pampa Húmeda. En primer lugar, la práctica experimental de promoción de esta pastura utilizando glifosato allí llevada a cabo, nos dio la posibilidad de obtener raíces de una especie vegetal taxonómicamente muy cercana a *L. corniculatus*, implantada en suelos crónicamente expuestos a glifosato. En segundo lugar, los lotes muestreados se ubican en el territorio de la Pampa deprimida, en donde la baja fertilidad y alta probabilidad de anegamiento asemejan la futura zona de implantación de la especie vegetal, según la estrategia propuesta. Es así como las condiciones a las que los ejemplares “*wild type*” de *Lotus* recolectados están sujetos coinciden, en gran medida, con aquellas esperadas durante la

implantación del sistema de rizorremediación. Por último, la posibilidad de trabajar en colaboración con la Chacra experimental Manantiales, dependiente del INTA, es una excelente oportunidad, ya que allí se llevan a cabo más de 20 ensayos anuales, y sus profesionales se encuentran siempre bien predispuestos. Todo esto, sumado a la maquinaria específica y el invaluable asesoramiento allí brindado, hace de este establecimiento un sitio ideal para llevar a cabo los futuros ensayos a campo de la o las estrategias de rizorremediación.

En el capítulo 4 se describió como se llevó a cabo el aislamiento de microorganismos a partir de distintas muestras y tratamientos presentes en los lotes sujetos al proceso de promoción de pasturas y, a la vez, se llevó a cabo la caracterización fisicoquímica y microbiológica de dichas muestras. Estudios realizados con técnicas independientes de cultivo mostraron la influencia sobre las comunidades microbianas del efecto rizosférico por sobre el manejo agronómico (que incluye al uso de glifosato) y las propiedades edáficas. Sin embargo, al comparar “suelos tratados” vs. “suelos control”, se encontró que dos lotes con propiedades edáficas similares podrían presentar diferencias respecto a la estructura de su comunidad. Esto sugiere que, una vez asegurada la presencia de la cepa en experimentos bajo condiciones controladas, la estrategia de vehiculización de microorganismos mediante inoculación podría ser exitosa a campo, ya que el efecto rizosférico podría asegurar su continuidad en función del tiempo. Por supuesto que este tipo de conclusiones son tomadas como directrices a la hora de proponer nuevos estudios, ya que sería erróneo suponer que este efecto se impondrá en cualquier situación agronómica, a partir haber estudiado solo dos tipos de manejo y dos suelos agronómicos distintos. En un futuro, se espera estudiar las consecuencias de la implantación del mismo cultivar de Lotus en suelos con una mayor diversidad de manejos, climas y propiedades agronómicas. Es así que los estudios de ecología microbiana pueden complementar fuertemente los estudios de remediación de suelos, mejorando las oportunidades de éxito.

Los cultivos de enriquecimiento realizados permitieron obtener un banco de cepas tolerantes y con la capacidad de degradar glifosato, las cuales fueron caracterizadas pertinentemente durante el capítulo 5. El casi total predominio de *Alphaproetobacterias* destacó ciertamente dentro de los resultados obtenidos. Estudios de *amplicon sequencing* sobre las comunidades de las cuales estos microorganismos fueron aislados podrían definir si este predominio se basó en el gran aporte inicial de esta clase o si el procedimiento de aislamiento y, sobre todo, el uso de glifosato como fuente de fósforo, fueron los responsables de este hallazgo. Si bien la C-P liasa está presente en microorganismos filogenéticamente muy diversos, puede que aquellas con la capacidad específica de degradar glifosato estén relacionadas con la clase *Alphaproteobacteria*. Nuevos campos en la investigación del complejo C-P liasa se abren, ahora con objetivos orientados a procesos biotecnológicos.

Las cepas fueron investigadas tanto por su capacidad para tolerar y degradar glifosato, como por su capacidad de promover el crecimiento vegetal en ensayos in vitro. Se observó la presencia de múltiples capacidades de promoción de crecimiento vegetal en cada cepa, en conjunto con una respuesta muy variada respecto a la tolerancia. No existe una relación aparente entre ambas características, si bien la integración de ambos estudios, en conjunto con las propiedades culturales de cada cepa permitió definir microorganismos candidatos para ser estudiados y caracterizados más profundamente y, eventualmente, proseguir con ensayos de interacción planta-microorganismo. En este punto, las secuenciaciones de los genomas completos de *Ochrobactrum* sp. P6BS-III y *Rhizobium* sp. P44RR-XXIV permitieron obtener una vasta información sobre las propiedades previamente evaluadas mediante técnicas bioquímicas y de microbiología clásica y, a su vez, forma ahora parte de la información disponible frente a la eventual evaluación de cualquier propiedad o interacción con otro organismo que se desee estudiar. Los genomas completos fueron estudiados también respecto al género del cual forman parte, mediante genómica comparativa. De estas comparaciones surgió información relevante, como ser que *Ochrobactrum* sp. P6BS-III es el primer genoma secuenciado de su especie, aportando una gran cantidad de genes nuevos al género, y que *Rhizobium* sp. P44RR-XXIV no posee el plásmido de simbiosis para la fijación biológica de nitrógeno.

En el capítulo 6 se ensayaron los primeros estudios de interacción planta-microorganismo a partir de las cepas seleccionadas. Hasta donde el sistema permitió evaluar, los ensayos de inoculación en placas verticales mostraron que un desarrollo normal del Lotus y un gran crecimiento de la cepa para algunos microorganismos, entre los que se encontraron *Ochrobactrum* sp. P6BS-III y *Rhizobium* sp. P44RR-XXIV. Esta observación, en conjunto con el resto de las propiedades que cada una de estas dos cepas presenta, motivó continuar con estudios de mayor complejidad, que involucraron técnicas de biología molecular y distintos tipos de microscopías.

Por último, se llevó a cabo un ensayo de microcosmos con suelos de la Pampa deprimida, en el cual se pudo observar que los sistemas planta-microorganismo propuestos mostraron una tendencia respecto a la degradación del herbicida en comparación con los controles, si bien es necesario en un futuro mejorar el método de inoculación, así como también el de cuantificación de glifosato. Se propone entonces en un futuro profundizar sobre estudios planta-microorganismo para entender el alcance real del efecto de la cepa inoculada, así como también llevar a cabo ensayos en invernadero con un número mayor de muestras, disponiendo de los recursos analíticos necesarios.

Finalmente, considero que este trabajo de tesis ha tenido siempre presentes los desafíos de la implementación a escala campo de las estrategias de fito/rizorremediación para que, más allá de su continuidad en un equipo de investigación en biotecnología vegetal, sea de interés para distintos entes

gubernamentales y privados que piensen en que los cambios en el sistema agrícola de nuestro país son posibles.